

# Inzidenz und Spezifität von HLA-DR Antikörpern in Seren nierentransplanterter Patienten

**FABRICE C. RENNER**



**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

# Inzidenz und Spezifität von HLA-DR Antikörpern in Seren nierentransplanterter Patienten

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Fabrice Christoph Renner**

aus Marburg

Gießen 2008

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Betreuer: Prof. Dr. med. Gregor Bein

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gregor Bein
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Tag der Disputation: 14. 11. 2008

*Es gibt keine reine Wahrheit, aber ebenso wenig  
einen reinen Irrtum. (Friedrich Hebbel)*

# Inhaltsverzeichnis

Seite		
1	Einleitung	7
1.1	Klinische Aspekte der Nierentransplantation.....	7
1.2	Ursachen und Risikofaktoren des Funktionsverlusts transplanterter Nieren .....	7
1.3	Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren der Transplantatabstoßung .....	8
1.4	Der Major Histocompatibility Complex (MHC).....	11
1.4.1	Bedeutung der HLA-Kompatibilität zwischen Spendern und Empfängern von Nierentransplantaten .....	14
1.4.2	Bedeutung von HLA-Klasse II Antikörpern für akute und chronische Abstoßung allogener Nierentransplantate .....	18
1.5	Methoden der Detektion von HLA-DR Antikörpern .....	19
1.5.1	Mikro-Lymphozytotoxizitätstest.....	19
1.5.2	Durchflußzytometrie .....	19
1.5.3	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens (MAILA) als ELISA-basiertes Verfahren .....	20
2	Problemstellung	22
3	Material	23
3.1	Reagenzien .....	23
3.2	Monoklonale Antikörper .....	24
3.3	Geräte .....	24
3.4	Laborbedarf .....	25
4	Methoden	27
4.1	Studienprotokoll.....	27
4.1.1	Auswahl der Patienten.....	27
4.1.2	Definitionen.....	27
4.1.3	Auswahl der Serumproben .....	28
4.2	Auswahl der lymphoblastoiden B-Zelllinien .....	29
4.3	Zellkultur.....	29
4.3.1	Auftauen .....	31
4.3.2	Kultivieren.....	31
4.3.3	Einfrieren.....	31
4.3.4	Fixieren.....	32

4.4	MAILA.....	32
4.4.1	Testprinzip.....	32
4.4.2	Puffer und Lösungen .....	33
4.4.3	Durchführung .....	35
4.4.4	Methodische Voruntersuchungen.....	36
4.4.4.1	Optimierung der Testbedingungen des MAILA .....	36
4.4.4.1.1	Bestimmung der optimalen Konzentration des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers L.243 .....	36
4.4.4.1.2	Bestimmung der benötigten Menge an humanem Serum .....	37
4.4.4.1.3	Bestimmung der optimalen Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti- Mensch Fc $\gamma$ Antikörpers .....	38
4.4.4.2	Bestimmung der Negativ-Kontrollen .....	39
4.4.4.3	Bestimmung des Negativ-Positiv- <i>Cut-off</i> .....	39
4.4.4.4	Bestimmung der Positiv-Kontrollen.....	40
4.5	Vergleich der Sensitivität zwischen dem Mikro-Lymphozytenzytotoxizitätstest (LCT) und dem MAILA .....	40
4.5.1	Isolierung von B-Lymphozyten aus peripheren venös entnommenem Blut.....	40
4.5.2	Thrombozytenabsorption .....	41
4.5.3	Lymphozytenzytotoxizitätstest (lymphocyte cytotoxicity test, LCT).....	42
4.6	Untersuchung der Spezifität des MAILA.....	43
4.7	Statistische Methoden .....	44
5	Ergebnisse .....	45
5.1	Patientencharakteristika .....	45
5.2	Vergleich der Sensitivität von LCT und MAILA .....	46
5.3	Ermittlung der Spezifität des MAILA.....	47
5.4	Prävalenz von HLA-DR Antikörpern in allen untersuchten Seren .....	49
5.4.1	Prävalenz der HLA-DR Antikörper bei Patienten mit und ohne HLA-DR <i>mismatch</i> .....	50
5.4.2	Prävalenz der HLA-DR Antikörper vor Nierentransplantation .....	51
5.4.3	Prävalenz von HLA-DR Antikörpern nach Stratifizierung für Geschlecht .....	52
5.5	Spezifität der nachgewiesenen HLA-DR Antikörper.....	53
5.5.1	Aufteilung von monospezifischen und polyspezifischen Seren.....	54
5.5.2	Zusammenhang zwischen HLA-DR <i>mismatch</i> und Antikörper-Spezifität.....	54
5.5.3	Prävalenz von Antikörpern gegen HLA-DR Antigene des Empfängers.....	56



6	Diskussion	57
6.1	MAILA als Methode zur Detektion von HLA-DR Antikörpern.....	57
6.2	Ergebnisse der klinischen Studie.....	60
6.2.1	Prävalenz von HLA-DR Antikörpern .....	60
6.2.2	Prävalenz präformierter HLA-DR Antikörper .....	61
6.2.3	Prävalenz nach der Transplantation nachweisbarer HLA-Klasse II Antikörper.. .....	62
6.2.4	Zusammenhang von HLA-DR <i>mismatch</i> , Bildung spezifischer Antikörper und Abstoßung.....	62
6.2.5	Mögliche Ursachen für Transplantatabstoßungsreaktionen in Abwesenheit von HLA-DR Antikörpern.....	63
6.3	Ausblick .....	64
7	Anhang	66
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	66
7.2	Tabellen.....	67
7.3	Literaturverzeichnis.....	83
7.4	Abbildungsverzeichnis .....	90
7.5	Tabellenverzeichnis.....	911
8	Selbständigkeitserklärung	93
9	Zusammenfassungen	94
10	Danksagungen	94
11	Lebenslauf	97

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Aspekte der Nierentransplantation

Die Nierentransplantation ist eine 1954 in Boston von MURRAY erstmals erfolgreich am Menschen (1) durchgeführte Therapieform der chronischen Niereninsuffizienz. Einem verstorbenen oder lebenden Spender wird eine Niere mitsamt zu- und abführenden Gefäßen sowie dem Harnleiter entnommen. Die explantierte Niere wird zumeist heterotop, extraperitoneal in der kontralateralen *Fossa iliaca* des Empfängers platziert, wobei die Gefäße in der Regel an die *Vasa iliaca externa* anastomosiert werden (2). Die Harnableitung wird in den meisten Fällen mittels einer Ureterozystoneostomie nach GREGOIR wiederhergestellt (3).

Im Jahr 2003 wurden in Deutschland 2111 Nierentransplantationen durchgeführt. In 1882 Fällen wurde die Transplantation einer Leichenniere vorgenommen, in 229 Fällen stammte die Niere von einem lebenden Spender. Die 1-Jahres-Überlebensrate der im Zeitraum von 1990 bis 2002 in Deutschland transplantierten Nieren betrug bei Lebendspenden ca. 95%, die 3-Jahres-Überlebensrate ca. 89% und die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 82%. Bei Leichennieren betrug die 1-Jahres-Überlebensrate ca. 83%, die 3-Jahres-Überlebensrate ca. 75% und die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 68% ( <http://www.dso.de>).

## 1.2 Ursachen und Risikofaktoren des Funktionsverlusts transplanteder Nieren

Die bedeutsamste Komplikation der Nierentransplantation ist der Funktionsverlust des transplantierten Organs. Dieser muss nicht zwingend zu einem kompletten Erlöschen der Transplantatfunktion führen. Je nach zeitlichem Ablauf des Funktionsverlusts unterscheidet man akute von chronischen Formen. Die häufigste zum akuten Funktionsverlust führende Komplikation ist die akute Abstoßungskrise. Tabelle 1 listet die Inzidenzen der verschiedenen Formen des akuten renalen Transplantatfunktionsversagens auf.

**Tabelle 1: Ursachen früher postoperativer Dysfunktion bei Nierentransplantaten nach (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10) und (11)**

Schädigungsart	Inzidenz
Akute Abstoßung	33% - > 50% (4), (6), (8)
Ischämische Schädigung (akute tubuläre Nekrose)	> 20% (4), (8)
Infektion	35% (11)
Medikamententoxizität	<sup>I</sup>
Schädigung durch Rezidiv der Grundkrankheit <sup>II</sup>	5 – 20% (5), (7)
Vaskuläre Komplikationen <sup>III</sup>	1 – 25% (6), (9), (10)
Urologische Komplikationen <sup>IV</sup>	2 – 14% (8), (9)

<sup>I</sup> Zur Inzidenz des durch Medikamententoxizität (insbesondere Ciclosporin A) verursachten akuten Funktionsverlusts von Transplantatnieren sind keine Zahlen veröffentlicht.

<sup>II</sup> Laut DENTON und SINGH sowie SUTHANTHIRAN und STROM führen auch Rezidive der Grundkrankheit wie z. B. fokal segmentale Glomerulosklerose, membranoproliferative Glomerulonephritis oder hämolytisch urämisches Syndrom zu akuten Funktionsverlusten von Nierentransplantaten.

<sup>III</sup> Der Begriff Vaskuläre Komplikationen umfasst neben arteriellen und venösen Perfusionsstörungen auch postoperative Komplikationen wie z. B. Insuffizienz der Gefäßanastomosen, Gefäßzerreißung mit nachfolgender Bildung von Pseudoaneurysmen oder prä- bzw. intrarenalen *Shunts*.

<sup>IV</sup> Der Begriff Urologische Komplikationen umfasst Störungen infolge Urinleck und Harnleiterobstruktionen, die beide auf den selben Pathomechanismen beruhen, nämlich Problemen der Ureterozystoneostomie.

Ein langfristiger Funktionsverlust der Transplantatniere ist vor allem durch die chronische Abstoßung bedingt (8). Weitere Ursachen sind die chronische Nephrotoxizität von Ciclosporin A und Rezidive der Grundkrankheit.

### **1.3 Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren der Transplantatabstoßung**

Als Abstoßung wird ein immunologisch bedingter Funktionsverlust eines transplantierten Organs bezeichnet. Dabei reagiert das Immunsystem des Empfängers gegen das als körperfremd erkannte Allotransplantat.

Man unterscheidet zwischen einer zellulären und einer humoralen Immunreaktion gegen das Transplantat, entsprechend zwischen einer zellulären und humoralen Abstoßung. Bei der zellulären Abstoßung kommt es zu einer Schädigung von Transplantatgewebe durch alloreaktive zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen. Bei der humoralen Abstoßung wird das Transplantat durch zytotoxische Antikörper geschädigt.

Die Immunreaktion wird durch T-Lymphozyten induziert, die mittels ihrer T-Zell-Rezeptoren körperfremde Antigene erkennen.

Erkennen CD4-positive Helfer-T-Lymphozyten Antigene, werden u. a. Zytokine ausgeschüttet, die als Wachstumsfaktoren und Aktivatoren u. a. auf folgende Zellen wirken: CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. Zytotoxische T-Lymphozyten und Makrophagen sind Effektorzellen der zellulären Immunreaktion, B-Lymphozyten sind die Träger der humoralen Immunreaktion.

Zytotoxische CD8-positive T-Zellen zerstören Zellen, die allogene MHC-Antigene exprimieren oder auf einem körpereigenen HLA-Molekül präsentieren. Nach Erkennung der körperfremden Antigene über den T-Zell-Rezeptor sezernieren zytotoxische T-Zellen Perforine und *Granzyme*. Perforine polymerisieren in der Membran der Zielzelle und bilden dadurch Kanäle, über die *Granzyme* eindringen und Enzyme aktivieren, die zur Apoptose der Zielzelle führen. Alternativ können CD8-positive T-Zellen mit ihrem Fas-Ligand an das CD95-Antigen der Zielzelle binden und dadurch wiederum den programmierten Zelltod auslösen.

Makrophagen sowie polymorphkernige Neutrophile schädigen die das Fremd-Antigen tragenden Zellen und benachbarte Zellen durch eine als *delayed type hypersensitivity* (DTH) bezeichnete Reaktion. DTH wird als Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ bzw. als Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion in der Einteilung nach COOMBS und GELL bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine T-Zell vermittelte überschießende Reaktion gegen Fremd- oder Selbst-Antigen: Makrophagen werden durch CD4-positive T-Lymphozyten, die ein Fremd-Antigen erkannt haben, über das Zytokin Interferon- $\gamma$  aktiviert. Makrophagen sezernieren dann ihrerseits Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Chemokine, die eine Ent-

zündung auslösen. Weiterhin regen einige Zytokine Fibroblasten und glatte Muskelzellen zur Proliferation an.

B-Lymphozyten antworten auf die Aktivierung mit einer klonalen Expansion und der Synthese von spezifischen Immunglobulinen.

Man unterscheidet weiterhin je nach Zeitpunkt des Einsetzens einer Abstoßung eine hyperakute, akute und chronische Form (12).

Eine hyperakute Abstoßung setzt sofort nach Anastomosierung der Nierengefäße ein. Sie beruht auf der Bindung von präformierten Antikörpern des Empfängers an Antigene des Spenders (13), die in Gefäßen des Nierentransplantats zur Bildung von Koageln und Thromben und schließlich zur anämischen Infarzierung der Niere führt (14). Die hyperakute Abstoßung stellt eine rein humorale Immunreaktion dar.

Eine akute Abstoßungskrise setzt in den meisten Fällen von der 1. Woche bis zum 3. Monat nach der Transplantation ein, ist aber grundsätzlich zu jedem Zeitpunkt möglich (12). Sie imponiert als eine rasch ablaufende, febrile, fokale oder universelle Entzündungsreaktion des Transplantats. Bei einer akuten Abstoßung handelt es sich stets um eine zelluläre Immunreaktion. In einigen Fällen kann eine humorale Komponente begleitend auftreten.

Als Risikofaktoren für die Entstehung einer akuten Abstoßungskrise bezeichneten BOOM et al. HLA-DR Inkompatibilität von Spender und Empfänger, verzögert einsetzende Transplantatfunktion und vorbestehende Immunisierung (15). WOO und Mitarbeiter korrelierten akute Abstoßung zusätzlich mit jungem Alter von Transplantatnierenempfängern (16).

Als chronische Abstoßung definierten MATAS et al. die allmähliche Verschlechterung der Transplantatfunktion, die mindestens 3 Monate *post operationem* einsetzt und über mindestens 6 Monate andauert in Verbindung mit einer für die chronische Abstoßung charakteristischen Biopsie bzw. Angiographie (17). Veränderungen, denen eine chronische Abstoßung mit großer Wahrscheinlichkeit zugrunde liegt, sind im Biopsat vor allem an Gefäßen zu finden: Zerreißung der *Elastica*, Nachweis von Entzündungszellen und Proliferation von Myofibroblasten in der fibrotischen *Intima* und die Bildung einer zweiten „*Neointima*“ (18). Die

für die chronische Abstoßung charakteristischen Gefäßveränderungen sind auch angiographisch in Form einer progressiven Lumeneinengung insbesondere der glomerulären Blutleiter nachweisbar. (19).

In allen anderen Fällen, in denen ein chronischer Funktionsverlust von Transplantatnieren nicht mit den genannten Gefäßveränderungen einhergeht, sollte man von chronischer Transplantatnephropathie sprechen.

Die Pathogenese ist laut WILHELM et al. in drei aufeinander folgende Phasen unterteilbar: In der ersten kommt es zu einer humoralen Immunreaktion gegen Endothelzellen der Transplantatnierengefäße, in der zweiten zu einer zellulären Immunreaktion nach Einwanderung von T-Lymphozyten und Makrophagen in das Gefäßendothel. In der dritten Phase vollzieht sich ein progressiver fibröser Umbau des perivaskulären Bindegewebes, der durch von Makrophagen sezernierte Zytokine (v.a. Interleukin-6 und  $\text{TNF}\alpha$ ) unterhalten wird (19).

Dieser Prozess wird durch weitere Schädigungen des Transplantats, die vom Immunsystem des Empfängers unabhängig sind, verstärkt und beschleunigt. Zu diesen zählen z. B. Schäden durch eine lange kalte Ischämiezeit und dem damit verbundenen Reperfusionsschaden, eine Infektion mit Zytomegalievirus (CMV), die Toxizität von Immunsuppressiva und ein erhöhter Blutdruck (19). Neben diesen Faktoren werden akute Abstoßungskrisen von verschiedenen Autoren als besonders bedeutsamer Risikofaktor für das Entstehen einer chronischen Abstoßung bezeichnet (20-24). Verschiedene Untersucher beschrieben eine signifikante Assoziation von HLA-Antikörpern, die nach der Transplantation gebildet wurden und nachfolgender chronischer Abstoßung.

## **1.4 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)**

Als MHC wird ein auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiertes außergewöhnlich polymorphes System von Genen bezeichnet (25). Es kodiert u. a. für die HLA-Moleküle, Glykoproteine, die an der Zelloberfläche exprimiert werden. Sie dienen dazu, den T-Lymphozyten von außen aufgenommene, in der Zelle prozessierte (exogene) oder im Zytoplasma produzierte (endogene) Peptide zu präsentieren. T-Zellen erkennen diese Peptide über ihren T-Zell-Rezeptor nur in Kombination mit einem MHC-Molekül. Diesen Umstand nennt man auch die MHC-Restriktion der Antigenerkennung (26). Man unterteilt die Glykoproteine in Klasse I-

und Klasse II-Moleküle. Dieser Unterteilung liegen strukturelle und funktionelle Unterschiede zugrunde.

Die wichtigsten HLA-Klasse I-Moleküle werden durch die Genorte HLA-A, -B und -C kodiert und kommen auf den meisten kernhaltigen Zellen und Thrombozyten vor. Sie präsentieren CD8-positiven T-Lymphozyten endogene Peptide.

Die auf den Genorten HLA-DP, -DQ und -DR kodierten HLA-Klasse II-Moleküle werden konstitutiv auf Antigen präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Sie können fakultativ unter Stimulation von Zytokinen, insbesondere IFN- $\gamma$  aber auch von T-Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert werden. HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren CD4-positiven T-Lymphozyten exogene Peptide.

Neben den Unterschieden im Gewebeverteilungsmuster und in der Funktion unterscheiden sich HLA-Klasse I- und II-Moleküle noch in weiteren Punkten, die in Tabelle 2 angegeben sind:

**Tabelle 2: Unterschiede zwischen HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Molekülen**

Merkmal	HLA-Klasse I-Moleküle	HLA-Klasse II-Moleküle
Molekularer Aufbau	In der Zellmembran verankerte, in drei Domänen unterteilte $\alpha$ -Kette und nonkovalent gebundenes $\beta$ 2-Mikroglobulin	Dimer aus $\alpha$ - und $\beta$ -Kette; die Ketten sind beide in der Zellmembran verankert und in 2 Domänen unterteilt
Peptidbindungsstelle	In einer aus Abschnitten der $\alpha$ 1- und der $\alpha$ 2-Domäne gebildeten Grube	In einer aus Abschnitten der $\alpha$ 1- und der $\beta$ 1-Domäne gebildeten Grube
Träger der alloogenen Determinanten	$\alpha$ 1- und $\alpha$ 2-Domäne	$\alpha$ 1- und $\beta$ 1-Domäne

Zwei herausragende Eigenschaften des MHC-Komplexes sind die Polygenie und der allelische Polymorphismus.

Als Polygenie bezeichnet man die Abhängigkeit eines Erbmerkmals von verschiedenen Genen (27). So umfasst die MHC-Klasse I-Region 17 Gene, von denen die 3 oben genannten, HLA-A, -B und -C, die größte Rolle spielen. In der MHC-Klasse II-Region unterteilt man drei Subregionen: HLA-DP, -DQ und -DR. Die HLA-DP und die HLA-DQ Subregionen umfassen je 4 Gene, von denen je 2 als Pseudogene nicht exprimiert werden. In der HLA-DR Subregion sind 10 Gene bekannt: DRA, DRB1 – DRB9. Nur DRA, DRB1, DRB3, DRB4 und DRB5 werden exprimiert, DRB2 und DRB6 – DRB9 stellen Pseudogene dar. Das mit dem Buchstaben A versehene Gen kodiert für die  $\alpha$ -Kette des Moleküls, während die mit B bezeichneten Gene für die  $\beta$ -Kette kodieren.

Die meisten MHC-Gene sind sehr polymorph. Das bedeutet, dass eine Vielzahl verschiedener Allele eines Gens bei verschiedenen Individuen einer Population vorkommt. So waren im Januar 2003 für das DRB1-Gen 330 verschiedene Allele bekannt (<http://www.anthonynolan.com>). Dabei ist die allelische Variabilität auf die Teile der Gene konzentriert, die für die Antigen-Bindungs-Stellen der Moleküle kodieren.

Die Polygenie und der allelische Polymorphismus des MHC-Komplexes stellen einen Selektionsvorteil dar. Durch diese beiden Eigenschaften wird sichergestellt, dass die Individuen einer Population zusammengekommen über ein großes Repertoire an HLA-Rezeptoren verfügen. Die Individuen der Population zusammengekommen können dadurch gegen viele verschiedene Krankheitserreger eine effiziente Immunreaktion auslösen (28).

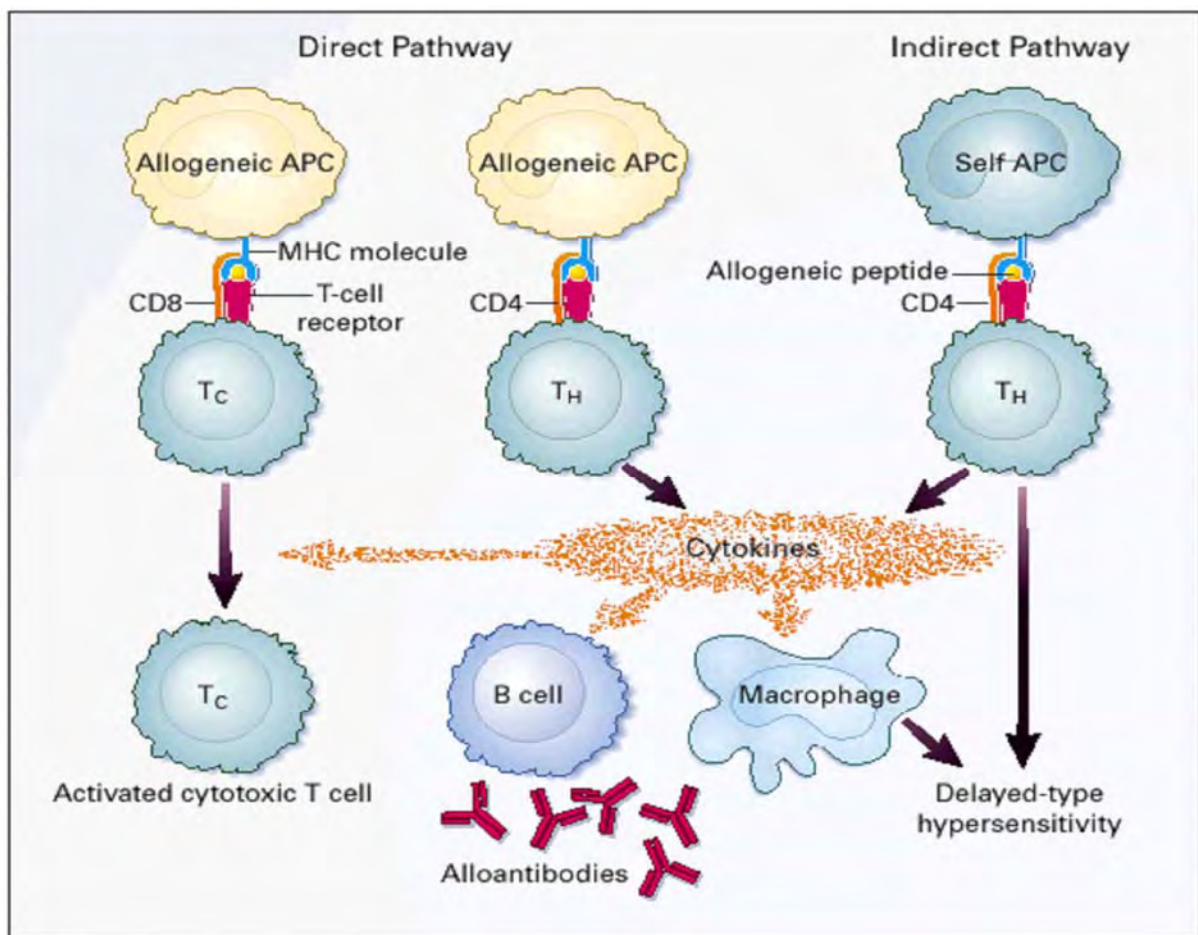
HLA-Gene werden in der Regel als Haplotyp vererbt und kodominant exprimiert. Als Haplotyp bezeichnet man einen kompletten gekoppelten Satz von Genen auf demselben Chromosom.



### 1.4.1 Bedeutung der HLA-Kompatibilität zwischen Spendern und Empfängern von Nierentransplantaten

Aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus des HLA-Systems ist es sehr wahrscheinlich, dass zwei genetisch nicht miteinander verwandte Individuen zahlreiche differente Allele besitzen. HLA-Moleküle des Spenders, die der Empfänger nicht exprimiert, so genannte *HLA-mismatches*, können prinzipiell auf drei verschiedenen Wegen eine Immunreaktion auslösen (sh. Abbildung 1) (29):

**Abbildung 1: Wege der Erkennung allogener MHC-Moleküle und Mechanismen der Transplantat-Abstoßung nach (29)**

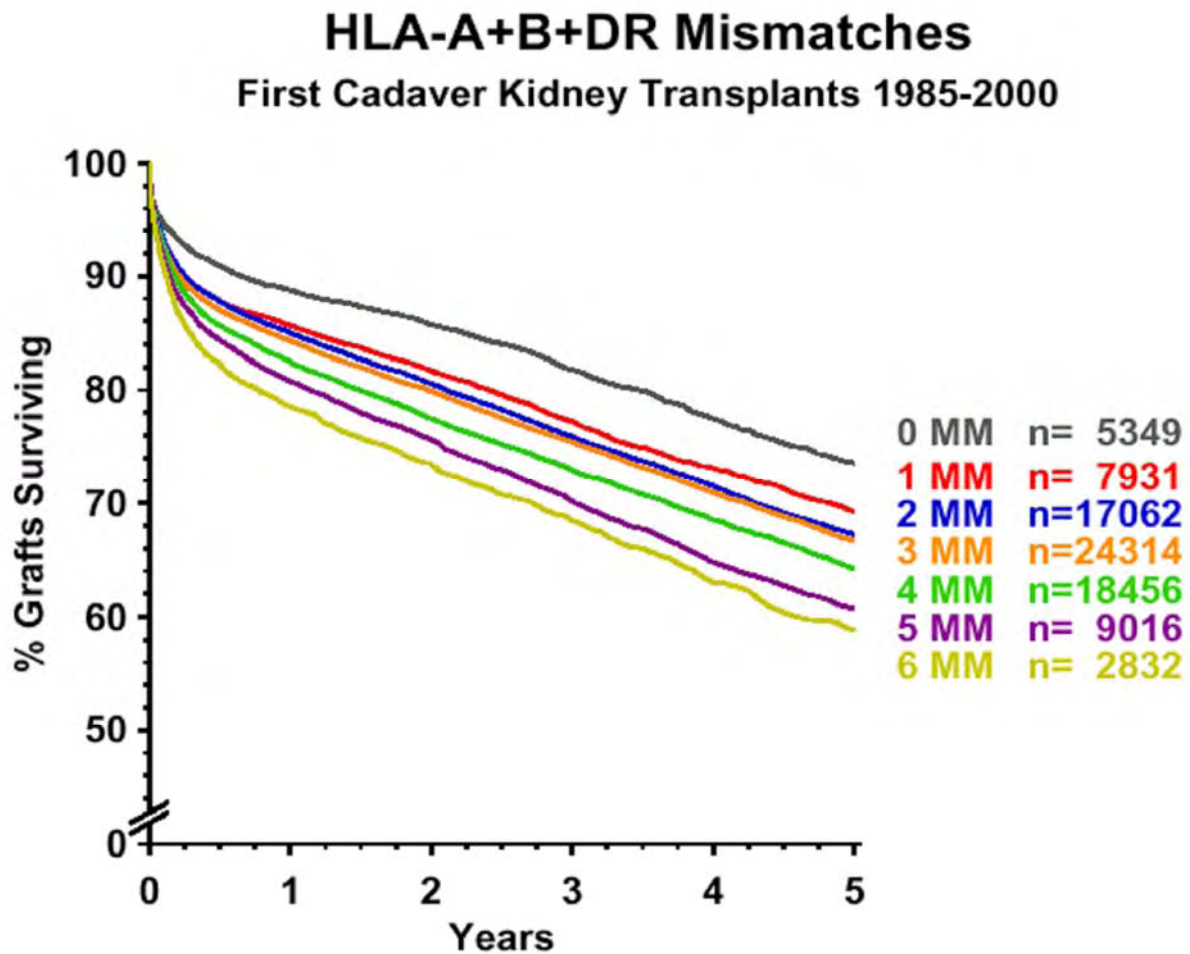


*Direct Pathway* = direkter Weg; *Indirect Pathway* = indirekter Weg; *Allogeneic APC* = allogene Antigen präsentierende Zelle; *Self-APC* = Antigen präsentierende Zelle des Empfängers; *MHC molecule* = MHC-Molekül; *T-cell receptor* = T-Zell Rezeptor; *Allogeneic peptide* = allogenese Peptid; *T<sub>C</sub>* = zytotoxische T-Zelle; *T<sub>H</sub>* = Helfer-T-Zelle; *Cytokines* = Zytokine; *Activated cytotoxic T cell* = aktivierte zytotoxische T-Zelle; *B-cell* = B-Zelle; *Alloantibodies* = Allo-Antikörper; *Macrophage* = Makrophage; Erläuterung der Abbildung im Text

Das Fremd-MHC-Molekül wird entweder direkt oder indirekt erkannt. Bei der direkten Erkennung werden empfängereigene T-Zellen durch allogene MHC-Moleküle auf Zellen des Spenders aktiviert. Die indirekte Erkennung hat zur Voraussetzung, dass Fremd-HLA-Moleküle oder Spenderzellen von empfängereigenen Antigen-Präsentierenden Zellen phagozytiert wurden. Die aus dem allogenen HLA-Molekül durch Prozessierung entstandenen Peptide werden CD4-positiven, Helfer-T-Lymphozyten auf dem autologen HLA-Molekül präsentiert. CD4-positive T-Zellen können mithin sowohl indirekt als auch direkt spenderspezifische HLA-Moleküle erkennen. Nach Erkennung der allogenen HLA-Merkmale aktivieren die Helfer-T-Lymphozyten die Effektorzellen, nämlich zytotoxische T-Lymphozyten, Makrophagen oder B-Lymphozyten, die gegen das Fremd-Antigen vorgehen. Zytotoxische, CD8-positive T-Zellen können körperfremde HLA-Merkmale auch direkt erkennen.

Auswertungen der *Collaborative Transplant Study* (CTS) zeigten, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Nierentransplantaten bei ersttransplantierten Leichennierenempfängern um so niedriger war, je mehr *mismatches* auf den HLA-A, -B und -DR Loci vorlagen. Bei Empfängern, die auf jeweils beiden Allelen der 3 angesprochenen HLA-Gene nicht mit dem Spender identisch waren, die also 6 *mismatches* aufwiesen, registrierte man die schlechteste 5-Jahres-Überlebensrate der Transplantate, bei Empfängern, die für alle 6 Allele auf den 3 Loci mit dem Spender identisch waren, die also kein *mismatch* aufwiesen, die beste. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 2 dargestellt.

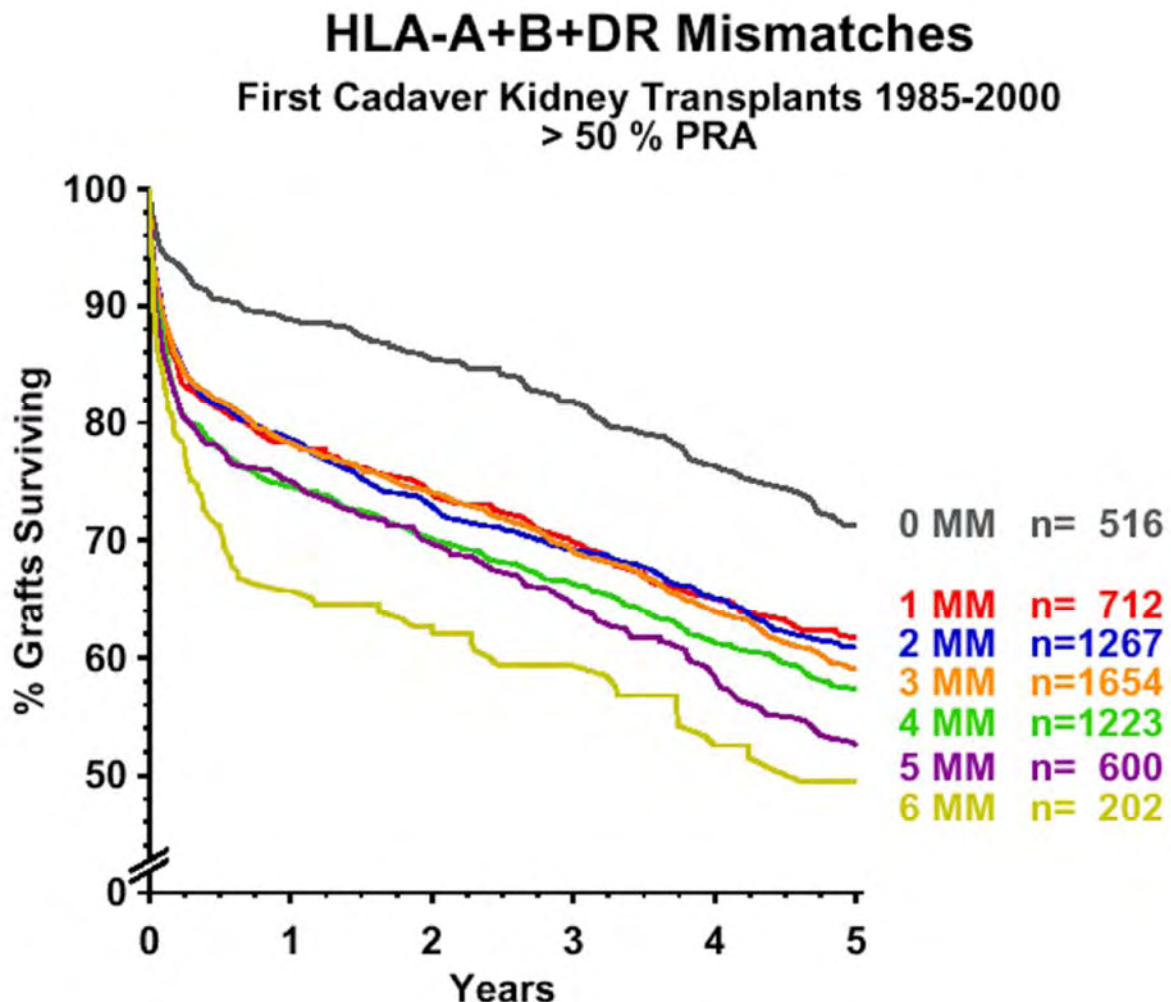
Abbildung 2: 5-Jahres-Überlebensrate primärer Leichennierentransplantate in Abhängigkeit von der Anzahl der *mismatches* nach (<http://www.cts.de>)



*First Cadaver Kidney Transplants* = Primäre Leichennierentransplantate; *% Grafts Surviving* = Transplantat-überlebensrate in Prozent; *Years* = Jahre; MM = *mismatch(es)*; Erläuterung im Text; nach (<http://www.cts.de>)

Diese Beobachtung fand sich in noch stärker akzentuierter Form bei Patienten, bei denen vor der Transplantation Antikörper gegen HLA-A, -B oder -DR Antigene nachgewiesen worden waren (s. Abbildung 3).

**Abbildung 3: 5-Jahres-Überlebensrate primärer Leichennierentransplantate in Abhängigkeit von der Anzahl der *mismatches* bei Patienten mit hoher Präimmunsierung nach (<http://www.cts.de>)**



Legende: > 50 % PRA = > 50 % *panel reactive antibodies*: Patienten, deren vor der Transplantation getestete Seren Antikörper gegen mehr als 50 % der Testzellen eines ausgewählten Testpanels enthielten; Rest: s. Abb. 2; Erläuterungen im Text; nach (<http://www.cts.de>)

Ein besonders starker Einfluss auf das kurzfristige und langfristige Transplantat-Überleben wurde für die Übereinstimmung von Spender und Empfänger auf dem HLA-DR Locus beobachtet: Verglich man das 1-Jahres-Überleben von Transplantaten, die nur hinsichtlich eines Genortes inkompatibel mit den Empfänger-Merkmalen waren, so ergab sich, dass

*mismatches* auf den Allelen des HLA-DRB1 Gens den stärksten negativen Effekt auf das Transplantat-Überleben aufwiesen (30-33).

#### 1.4.2 Bedeutung von HLA-Klasse II Antikörpern für akute und chronische Abstoßung allogener Nierentransplantate

HLA-DR ist das wichtigste HLA-Klasse II Merkmal im Rahmen der Nierentransplantation. Die Bedeutung der Spender-Empfänger-Kompatibilität auf dem HLA-DR Locus für das Überleben von Nierentransplantaten ist statistisch gesichert. Bislang ist jedoch nicht beantwortet, welche Pathomechanismen dem erhöhten Risiko, eine Abstoßung zu erleiden und dem verminderten Transplantatüberleben bei einer HLA-DR Inkompatibilität zugrunde liegen.

Das Immunsystem eines Empfängers bedient sich wie oben dargestellt zweier Wege, gegen Fremd-Antigen vorzugehen, einer zellulären, T-Zell-vermittelten und/oder einer Antikörper-vermittelten, humoralen Immunantwort.

Zur Bedeutung der humoralen Immunreaktion in der klinischen Nierentransplantation liegt eine Vielzahl von Untersuchungen vor. Während der stets deletäre Einfluss von HLA-Klasse I Antikörpern auf das Transplantat bekannt ist, stellt sich die Frage, welchen Effekt HLA-Klasse II Antikörper ausüben.

Präformierte Antikörper gegen HLA-DR Merkmale oder gegen B-Lymphozyten allgemein wurden sowohl mit einem verminderten Transplantatüberleben, einer eingeschränkten Transplantatfunktion und einem erhöhten Risiko akuter Abstoßung assoziiert (z. B. (34)) als auch mit einem günstigen Effekt („*enhancing effect*“) auf Transplantatüberleben und –funktion und einer geringeren Gefahr der Abstoßung (z. B. (35)). Andere Untersucher fanden weder einen schützenden noch einen deletären Einfluss (z. B. (36)).

Auch die Untersuchungsergebnisse bezüglich der klinischen Bedeutung nach der Transplantation neu gebildeter Antikörper ließen die drei oben erwähnten unterschiedlichen Interpretationen zu: HLA-DR Antikörper wurden sowohl mit einem verlängerten Überleben allogener Nierentransplantate in Zusammenhang gebracht (z. B. (35)) als auch mit akuter (z. B. (37))

und chronischer (z.B. (38)) Abstoßung korreliert. TING und MORRIS (39) zeigten im Gegensatz dazu, dass weder Funktion noch Überleben eines Transplantats mit der Produktion von B-Zell-Antikörpern korrelierte.

## **1.5 Methoden der Detektion von HLA-DR Antikörpern**

Zum Nachweis von HLA-Antikörpern werden drei grundlegende Verfahren, in unterschiedlichen Varianten angewendet:

### **1.5.1 Mikro-Lymphozytotoxizitätstest**

TERASAKI und McCLELLAND führten 1964 den so genannten Mikro-Lymphozytotoxizitätstest ein (40). Lymphozyten bekannter HLA-Spezifität werden nacheinander mit fraglich antikörperhaltigem Serum und Kaninchenkomplement inkubiert. Enthält das Serum Antikörper, die an Oberflächenmoleküle auf den Testzellen binden und Komplement aktivieren, kommt es zur Lyse der Membran der Testzellen, die dann selektiv anfärbbar sind. Die Auswertung erfolgt, indem man die Anzahl angefärbter Zellen mikroskopisch bestimmt.

### **1.5.2 Durchflußzytometrie**

GAROVOY, RHEINSCHMIDT, BIGOS et al. entwickelten 1983 erstmals ein durchflußzytometrisches Verfahren zur Bestimmung von HLA-Antikörpern (41). Bei der Durchflußzytometrie werden einzelne Zellen in Suspension als dünner Strahl einer Laserlichtquelle ausgesetzt. Photodetektorsysteme registrieren die Streuung des Laserlichts, die Hinweise auf Größe und Dichte der im Flüssigkeitsstrahl enthaltenen Zellen gibt. Weitere Lichtdetektorelemente sind für die Aufnahme von Fluoreszenz bestimmter Wellenlängenbereiche vorgesehen. So können Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper Aufschlüsse über das Antigenmuster oder den Antikörperbesatz der Zellen geben. Zum Nachweis von HLA-Antikörpern werden Zellen mit bekannten HLA-Antigenen mit dem zu untersuchenden Serum und markierten monoklonalen Antikörpern, die gegen humane Antikörper gerichtet sind, inkubiert. Über die Photodetektorsysteme kann man die Zellen, die den markierten Sekundär-Antikörper gebunden haben, auszählen und computertechnisch erfassen.

### 1.5.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens (MAILA) als ELISA-basiertes Verfahren

Als Methode zur Identifizierung der Spezifität von Antikörpern beschrieben VAN WEEMEN & SCHUURS 1971 zum ersten Mal das Prinzip des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (42): Dabei werden Antikörper aus einem Serum an einer mit Antigen beschichteten Festphase gebunden und über markierte Antikörper, die gegen humane Immunglobuline gerichtet sind, nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt je nach Markierung des letztgenannten Antikörpers mithilfe photo- oder radiometrischer Erfassungsgeräte.

1987 entwickelten KIEFEL, SANTOSO et al. ein auf dem ELISA-Prinzip basierendes Testverfahren zur Identifizierung thrombozytärer Antikörper und Antigene, den *monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens* (MAIPA) (43): Murine monoklonale Antikörper binden an thrombozytäre Oberflächenglykoproteine, die durch Solubilisierung der Blutplättchen gewonnen werden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden an eine Mikrotiterplatte gebunden, die mit monoklonalen Antikörpern gegen Antikörper der Maus beschichtet ist. Humane Immunglobuline, die an die immobilisierten Glykoproteine gebunden haben, können dann durch Zugabe eines markierten Antikörpers gegen humane Antikörper nachgewiesen werden. Es ist möglich, in diesem Testverfahren Antikörper gegen diese Glykoproteine oder die Glykoproteine selbst nachzuweisen. So adaptierten MUELLER-ECKHARDT, KIEFEL et al. den Test 1989 für die Suche nach leukozytären Antikörpern (44). Der *monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens* (MAILA)-assay wurde danach 1991 von LATTERMANN (45) und 1996 von SIEGLER (46) zur serologischen Typisierung von HLA-DP Antigenen an humanen B-Lymphozyten eingesetzt. NILSSON, VAN'T KLOOSTER et al. wandten die Technik 1994 zur Identifizierung boviner MHC-Klasse II-Genprodukte an (47). Der MAILA wurde auch zur Bestimmung von Antikörper-Spezifitäten verwendet: MUELLER-ECKHARDT, KIEFEL et al. 1990 (48) und LATTERMANN 1991 bestimmten Inzidenz und Spezifität von HLA-DP Antikörpern in Schwangeren-Seren. 1993 bestimmte eine Arbeitsgruppe um SANCHEZ die Spezifität verschiedener monoklonaler Antikörper mit Hilfe des MAILA (49). Im gleichen Jahr publizierten TEN HOOR, COOPMANS und ALLEBES eine Untersuchung zur Spezifität von präfor-

mierten B-Zell-reaktiven Alloantikörpern bei Nierentransplantatempfängern (50). 1995 fanden PFEIFFER, VOGELER et al. mit dem MAILA Antikörper gegen HLA-DP Antigene in Seren von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die auf eine Transplantation warteten. (51). In einer weiteren Studie wurde der MAILA zur Untersuchung von Seren allogener Knochentransplantatempfänger hinsichtlich der Entwicklung von HLA-Antikörpern verwendet (52). Der verwandte MAIPA gilt in der Bestimmung der Spezifität thrombozytärer Allo-Antikörper als Goldstandard (53).



## 2 Problemstellung

Die Bedeutung von HLA-DR Antikörpern für das Überleben und die Funktion transplanterter Nieren ist umstritten. Dies ist möglicherweise auf die Verwendung von Testmethoden wie dem LCT oder der Durchflußzytometrie zurückzuführen, deren Spezifität und Sensitivität eingeschränkt ist.

In dieser Untersuchung wurde der MAILA als Methode zur Detektion von HLA-DR Antikörpern eingesetzt. Die Antigene wurden von HLA-DR homozygoten, EBV-transformierten B-Zelllinien gewonnen. HLA-DR Moleküle einzelner Zelllinien wurden gegen einzelne Seren getestet. Dadurch wurden erstmalig Seren nierentransplanterter Patienten auf Antikörper gegen einzelne molekular definierte Antigene in einem ELISA-Testverfahren untersucht.

In einem retrospektiven Studienansatz wurde die Inzidenz und Spezifität von HLA-DR Antikörpern in konsekutiven Serumproben ersttransplanterter Leichennierenempfänger mit unterschiedlichem klinischen Verlauf (akute Abstoßungskrise, chronische Abstoßung und komplikationsloser klinischer Verlauf) nach der Transplantation bestimmt.

Folgende Fragen sollten im einzelnen beantwortet werden:

- Kann der MAILA als hinreichend sensible und spezifische Untersuchungsmethode zum Nachweis von HLA-DR Antikörpern eingesetzt werden?
- Unterscheiden sich Patienten mit akuter Abstoßung, chronischer Abstoßung und komplikationslosem klinischen Verlauf während der ersten drei Monate nach der Transplantation hinsichtlich der Inzidenz und/oder Prävalenz von HLA-DR Antikörpern?
- Sofern HLA-DR Antikörper nachweisbar sind, unterscheiden sich die Patienten hinsichtlich der Spezifität der HLA-DR Antikörper?

## 3 Material

### 3.1 Reagenzien

ACD = Adenin-Citrat-Dextrose; NBPI, Dreieich

BSA = *Bovine Serum Albumine* (22%); Ortho, Neckargemünd

DMSO (Dimethylsulfoxid) Hybri-max 99+%; Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Dynabeads HLA Class II; Dynal, Oslo (Norwegen)

Ethanol 95%; Riedel – de Haën Laborchemikalien, Seelze

FCS = *Foetal calf serum*, 500 ml; Eurobio, Les Ulis (Frankreich)

Kaninchenkomplement, lyophilisiert; BAG, Lich

L-Glutamin 200mM, 100 ml; Flow Laboratories, Irvine (Schottland)

NaCl 0,9% und aqua dest.; Pharmacia & Upjohn, Halden (Norwegen)

Natriumheparinat, Liquemin® N 25000 (1000 I.E./ml); Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

OPD (ortho-phenyl-di-amine)-Tabletten, 2 mg *for* ELISA; DAKO, Glostrup, (Dänemark)

Paraffinöl; Fresenius, Bad Homburg

PBS (10x) w/o Calcium and Magnesium; Gibco BRL, Paisley (Schottland)

Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10000 *Units*/ml, PAA, Linz, (Österreich)

RPMI 1640 *with glutamine*, 500 ml; Gibco BRL, Paisley (Schottland)

RPMI 1640 *without glutamine*, 500 ml; Gibco BRL, Paisley (Schottland)

TRIS (Hydroxymethylaminomethan); Carl Roth, Karlsruhe

Triton X 100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol); Sigma Chemical, St. Louis, Missouri (USA)

Tusche, Deckendes Federschwarz, Aerocolor; Schmincke, Erkrath

Alle folgenden Agenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen:

Acridin-Orange

Calciumchlorid-Hexahydrat

EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure) = Titriplex III

Ethidiumbromid

HCl

Material

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%

Natriumcitrat-Dihydrat

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105,99 g/mol)

NaHCO<sub>3</sub> (84,01 g/mol)

NaN<sub>3</sub>, (65,01 g/mol)

NaOH

Paraformaldehyd, reinst

Perhydrol

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)

### 3.2 Monoklonale Antikörper

*AffiniPure* Ziege Anti-Maus IgG, Fcγ *fragment specific*, 1,8 mg/ml; Dianova, Hamburg

Anti-HLA-DR, *Pure*, 25 µg/ml; Becton Dickinson, San José, Kalifornien (USA)

*Peroxidase-conjugated AffiniPure* Ziege Anti-Mensch IgG, Fcγ *fragment specific*; Dianova, Hamburg

### 3.3 Geräte

Automatisches Beölungsgerät für Mikrottestplatten; Greiner, Frickenhausen

Brutschrank HERAccl; Heraeus-Instruments, Hanau

Bunsenbrenner, Labogaz 206; Campingaz, Givisiez (Schweiz)

Fluoreszenzmikroskop, Diavert Fluoreszenz; Leica, Bensheim

Invertmikroskop, Leitz Diaplan; Leitz, Wetzlar

Zellzählgerät = Microcellcounter CC 130; Sysmex, Long Grove, Illinois (USA)

Mini-Schüttler, MS 2; IKA-Works, Wilmington, North Carolina (USA)

pH-Meter, PHM 61; Radiometer, Kopenhagen (Dänemark)

Pipettierhilfe, Pipetboy aku; Integra Biosciences, Fernwald

Plattenlesegerät Tecan SLT; Labinstruments, Crailsheim

Präzisionswaage Mettler AE 100; Mettler-Toled, Gießen

Rüttelwasserbad, SW-21 C; Julabo Labortechnik, Seelbach

Sicherheitswerkbank, Klasse 2, Typ H; Heraeus-Instruments, Hanau

Thermomixer, 5437; Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Ultraschallbad, Bandelin RK 510 H; Merck Eurolab, Wien (Österreich)

Wasserbad mit Thermostat MP5; Julabo Labortechnik, Seelbach

Wasserstrahlpumpe; Laborinventar

Zentrifuge Biofuge 13; Heraeus-Instruments, Hanau

Zentrifuge Rotixa/A; Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

### 3.4 Laborbedarf

*Dispenser-Tips*; H. nerbe plus, Winsen/Luhe

Einfrierampullen Cryo Tubes, 1,8 ml; Nunc Intermed, Roskilde (Dänemark)

Einmalspritze à 20 ml, Luer; B. Braun, Melsungen

Einmal-Teströhrchen aus Glas, 75 x 12 x 0,6 mm; DADE Behring, Düringen (Schweiz)

Einmal-Teströhrchen aus Glas; Eigenanfertigung der Blutbank, Gießen

Gewebekulturflaschen à 200 ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey (USA)

Magnethalter MPC-6; Dynal, Oslo (Norwegen)

Messpipetten AS, DB 20: 0,1 ml, 10: 0,1 ml, 5: 0,05 ml; Hirschmann Laborgeräte, Hirschberg

Mikroliterpipette; PB 600-1 mit Spritze 705; Hamilton, Bonaduz (Schweiz)

Minisart® sterile Einmalfilter mit Porengröße 0,2 µm und 0,45 µm; Sartorius, Göttingen

Pasteur-Pipetten; H. nerbe plus, Winsen/Luhe

Perfusionsbesteck mit Flügeln, Micro-Flo®, 18 GA, 1,2 x 20 mm, Luer-Lock; LDKS Oversan Biomedica, Mailand (Italien)

Polyröhrchen, Rundboden, 13 ml, 95 x 16,8 mm; Sarstedt, Nümbrecht

Wägebapier; NeoLab MIGGE Laborbedarf, Leonberg

Die im folgenden genannten Materialien wurden alle von der Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen, bezogen:

Abdeckplatte, 82 x 127 mm

ELISA-Platte, F-Form, hochaffin, 8 x 12 Vertiefungen

Gewebekulturflaschen à 50 ml

Lamellenstopfen

Mehrzweckbecher

Mikrotestplatte 60 K, stapelbar

## Material

Pipetten mit Spitze à 1, 10, 25 ml

Polypropylen Röhrchen à 50 ml, steril

Polypropylen konisches Reagenzglas mit Schraubverschluss 12 ml, steril

Alle im folgenden genannten Materialien wurden von der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, bezogen:

*Dispenser*, Multipette® plus

Mikroliterpipette Eppendorf Research 0,5-10 µl

Mikroliterpipette 10-100 µl

Mikroliterpipette 100-1000 µl

Pipettenspitzen cristal, gelb und blau

Reaktionsgefäße ohne Deckel, 1,5 ml

Zentrifugierröhrchen, 1,5 ml

## 4 Methoden

### 4.1 Studienprotokoll

#### 4.1.1 Auswahl der Patienten

Die Patienten wurden aus einer prospektiven Studie, die von Juli 1991 bis April 1994 an der Medizinischen Hochschule der Universität Lübeck stattfand (54), ausgewählt. Aus der Gruppe der Patienten, denen zum ersten Mal eine Niere transplantiert wurde, wählten wir retrospektiv zufällig 20 Patienten mit mindestens einer akuten Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation, die wir in der Gruppe A zusammenfassten. Weitere 20 Patienten mit unauffälligem klinischem Verlauf während der ersten drei Monate nach Transplantation bildeten die Kontrollgruppe. 13 Patienten mit chronischer Abstoßung fanden in die Gruppe B Eingang.

#### 4.1.2 Definitionen

Patienten, bei denen eine akute Abstoßungskrise aufgrund klinischer Befunde (Fieber, Schwellung des Transplantats, Abnahme der Diurese, Zunahme der Retentionswerte, Zunahme des Körpergewichts, Zeichen der Überwässerung, wie generalisierte Ödeme, Lungenödem, Pleuraerguss, Bluthochdruck) vermutet wurde, wurden einer Transplantatnierenbiopsie unterzogen. Das Biopsiematerial wurde histopathologisch untersucht. Wir wählten nur solche Patienten für Gruppe A aus, deren histopathologischer Untersuchungsbefund eine akute Abstoßung bestätigte. Für Gruppe B wurden solche Patienten ausgewählt, deren histopathologischer Untersuchungsbefund eine chronische Abstoßung ergab. Für die Kontrollgruppe wählten wir Patienten aus, die in den ersten 3 Monaten nach Transplantation keine Abstoßung erlitten hatten.

Als Datum einer akuten oder chronischen Abstoßung bestimmten wir den Zeitpunkt der Biopsie, deren histopathologische Untersuchung als Grundlage für die Auswahl in Gruppe A oder B diente.

#### 4.1.3 Auswahl der Serumproben

Im Rahmen der prospektiven Studie wurden konsekutive Seren von jedem Patienten gesammelt und bei -80°C asserviert.

In Gruppe A (Patienten mit akuter Abstoßung) wurden 3 Serumproben je Patient gewählt: Das erste Serum wurde im Zeitraum von längstens 7 Tage vor bis längstens 7 Tage nach Transplantation abgenommen. Es wurden 20 Seren untersucht, deren Abnahmezeitpunkt im Median an Tag 1 post-OP (Spannweite: Tag 0 bis Tag 7 post-OP) lag.

Die zweite Probe wurde im Zeitraum von bis zu 7 Tagen vor bis maximal 14 Tage nach dem Tag der Abstoßung abgenommen. Es wurden 19 Seren, die im Median 2,5 Tage nach Rejektion (Spannweite: Tag 7 vor bis Tag 13 nach Rejektion) abgenommen wurden, untersucht.

Das dritte Serum wurde im Zeitraum von mindestens 14 Tage und bis zu 6 Monaten nach dem Tag der Abstoßung gewonnen. 14 Seren, die im Median von Tag 23 (Spannweite: Tag 14 bis Tag 120) nach Rejektion stammten, wurden untersucht.

In Gruppe B (Chronische Abstoßung) untersuchten wir ein Serum pro Patient. Dieses wurde am Tag der Transplantatbiopsie gewonnen, die in der histopathologischen Untersuchung den Befund einer chronischen Abstoßung ergab. 13 Seren wurden untersucht. Ihr Abnahmezeitpunkt lag im Median am Tag der Biopsieentnahme (Spannweite: Tag 150 bis Tag 0 vor der Biopsieentnahme).

In der Kontrollgruppe wählten wir je zwei Seren pro Patient:

Die erste Probe wurde im Zeitraum von längstens 7 Tage vor bis längstens 7 Tage nach Transplantation abgenommen. 20 Seren, die im Median am Tag der Transplantation (Spannweite: Tag 4 prä- bis Tag 4 post-OP) gewonnen wurden, wurden untersucht.

Die zweite Probe musste im Zeitraum von mindestens 4 Wochen bis zu 6 Monate nach Transplantation abgenommen worden sein. Untersucht wurden 19 Seren, die im Median an Tag 39 (Spannweite: Tag 18 bis 104) post-OP abgenommen worden waren.

## 4.2 Auswahl der lymphoblastoiden B-Zelllinien

Für die Isolierung der HLA-DR Antigene verwandten wir in unseren Testverfahren Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Zelllinien aus dem Panel des zehnten Internationalen Histokompatibilitäts *Workshop*. Wir wählten HLA-DR homozygote B-Zelllinien. Alle häufigen serologischen HLA-DR Spezifitäten sollten mit den ausgewählten Zellen abgedeckt werden. In Tabelle 3 sind die HLA-DR Allele und die korrespondierenden serologischen Spezifitäten der ausgewählten B-Zelllinien angegeben. (55).

**Tabelle 3: Serologische Spezifitäten und Allele der verwendeten B-Zelllinien aus dem 10. Internationalen Histokompatibilitäts *Workshop***

WS # <sup>a</sup>	Name der Zelllinie	Serologische Spezifität		Allel (DRB1*)
		Hauptantigen	Splitantigen	
9005	HOM2	DR1		0101
9014	MGAR	DR2	DR15	1501
9009	KAS011	DR2	DR16	1601
9018	LOO81785	DR3	DR17	0301
9021	RSH	DR3	DR18	0302
9034	SAVC	DR4		0401
9035	JBUSH	DR5	DR11	
9038	BM16	DR5	DR12	1201
9058	OMW	DR6	DR13	1301
9054	EK	DR6	DR14	1401
9050	MOU	DR7		07
9069	MADURA	DR8		0801
9075	DKB	DR9		0901

<sup>a</sup> WS # = Im 10. Internationalen Histokompatibilitäts *Workshop* vergebene Nummer der B-Zelllinie

## 4.3 Zellkultur

Prinzip:

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen lymphoblastoiden B-Zelllinien werden nach dem Auftauen über mehrere Wochen kultiviert. Zu einem geeigneten Zeitpunkt werden Zellen aus



der Kultur abgeschöpft und für die Verwendung im MAILA mit Paraformaldehyd fixiert. Um ständig B-Zelllinien verfügbar zu haben, werden Aliquots der Kulturen wieder eingefroren.

### Medien:

Auftaumedium: 89,6 ml RPMI 1640 ohne Glutamin, 0,9 ml L-Glutamin, 0,9 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung und 0,3 ml Liquemin® wurden durch Filter der Porengröße 0,2 µm steril filtriert. Dazu wurden 89,6 ml FCS durch Filter der Porengröße 0,45 µm steril filtriert. Die Lösung wurde bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Kulturmedium: Zu 500 ml RPMI 1640 ohne Glutamin wurden je 5 ml L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin-Lösung sowie 1,5 ml Liquemin® durch Filter mit der Porengröße 0,2 µm und 128 ml FCS durch Filter mit der Porengröße 0,45 µm steril filtriert. Die Lösung wurde danach bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

PBS: 100 ml PBS (10x) wurden mit 900 ml aqua dest verdünnt und mit 3N NaOH auf pH 7,25 eingestellt. Die Lösung wurde bei +4°C verwahrt.

3N NaOH: 120 g NaOH-Plätzchen wurden in 1000 ml aqua dest gelöst.

Paraformaldehyd-Lösung 8%: 4 g Paraformaldehyd wurden auf der Präzisionswaage abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde, nachdem man den Kolben mit Aluminiumfolie verschlossen hatte, 30 Minuten im Wasserbad bei +70°C erhitzt. Anschließend wurden etwa 100 µl 3N NaOH zugegeben. Der weißliche Niederschlag im Kolben musste sich auflösen. Mit etwa 80 µl 3M HCl wurde die Lösung danach auf pH 7,25 eingestellt und in eine dunkle Flasche umgefüllt. Eine derart hergestellte Lösung war bei +4°C 14 Tage haltbar. Bei der Fixierung wird eine 1:4-Verdünnung der hergestellten Paraformaldehyd-Lösung eingesetzt.

3 M HCl: 262,8 ml HCl 37% wurden zu 737,3 ml aqua dest gegeben.

Lager-Puffer: Es wurde eine Lösung, aus 89 Teilen PBS, 10 Teilen BSA und einem Teil  $\text{NaN}_3$ -Lösung 10% hergestellt. Die Lösung war bei  $+4^\circ\text{C}$  6 Monate haltbar.

$\text{NaN}_3$  10%: 10 g  $\text{NaN}_3$  wurden in 100 ml aqua dest gelöst.

#### 4.3.1 Auftauen

Durchführung:

Die in Einfrierampullen vorliegenden gefrorenen Zellen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und im  $+37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad kurz angewärmt. Sobald die Zelllösung bis auf ein etwa erbsgroßes Stück aufgetaut war, wurde die Ampulle mit 0,5 ml Auftaumedium aufgefüllt. Nach kurzer Durchmischung wurde die Zelllösung in ein mit 1,5 ml Auftaumedium befülltes PP-Reagenzglas, 12 ml, pipettiert und 5 Minuten bei  $700 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das *Pellet*, nachdem man es in 2 ml Kulturmedium resuspendiert hatte, in eine Kulturflasche überführt und in einen Brutschrank ( $+37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ -Spannung) gestellt.

#### 4.3.2 Kultivieren

Durchführung:

Durch ungefähre Bestimmung der Zellkonzentration auf dem Invertmikroskop und Beurteilung der Farbe des Kulturmediums wurde der Wachstumsfortschritt der Zellkulturen täglich kontrolliert. Bei gutem Wachstum (entsprechend hohe Zellkonzentration, gelbe Färbung des Kulturmediums), wurde das selbe Volumen an frischem Kulturmedium wie in der Kulturflasche befindlich hinzupipettiert. Überschritt das Füllvolumen der 50-ml Zellkulturflaschen 20 ml oder das der 200-ml Zellkulturflaschen 75 ml, wurde das überschüssige Volumen in eine neue Flasche überpipettiert.

#### 4.3.3 Einfrieren

Durchführung:

Aus der Zellkultur entnommenes Volumen wurde in PP-Reagenzgläser, 12 ml, pipettiert und 5 Minuten bei  $700 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das *Pellet* in Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden 900  $\mu\text{l}$  Zelllösung in eine Einfrierampulle pipettiert und

100 µl DMSO, 99% hinzugefügt. Die Einfrierampullen wurden sofort im Anschluss in einem verschließbaren Styroporgefäß bei -60°C eingefroren und einen Tag später in flüssigen Stickstoff verbracht.

### 4.3.4 Fixieren

#### Durchführung:

Der Kultur entnommenes Volumen wurde in PP-Reagenzgläser, 50 ml, pipettiert und 5 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Nachdem man den Überstand dekantiert hatte, wurde das *Pellet* in 10 ml RPMI 1640 mit Glutamin resuspendiert. Ein Aliquot dieser Lösung wurde am Zellzählgerät ausgezählt. Die verbleibende Zelllösung wurde 5 Minuten bei 700 x g abzentrifugiert und nach Abkippen des Überstands mit PBS auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml Zelllösung wurde auf eine entsprechende Anzahl Eppendorf-Zentrifugierröhrchen verteilt und 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Im Anschluss daran wurde das *Pellet* in je 400 µl PBS und Paraformaldehyd-Lösung 2% resuspendiert und 5 Minuten bei +4°C inkubiert. Danach wurden 500 µl PBS pro Zentrifugierröhrchen dazugegeben, und 3 Waschschritte angeschlossen. Zuletzt wurde jedes Zentrifugierröhrchen mit 200 µl Lager-Puffer befüllt. Die Fixate wurden bei +4°C bis zu 100 Wochen aufbewahrt.

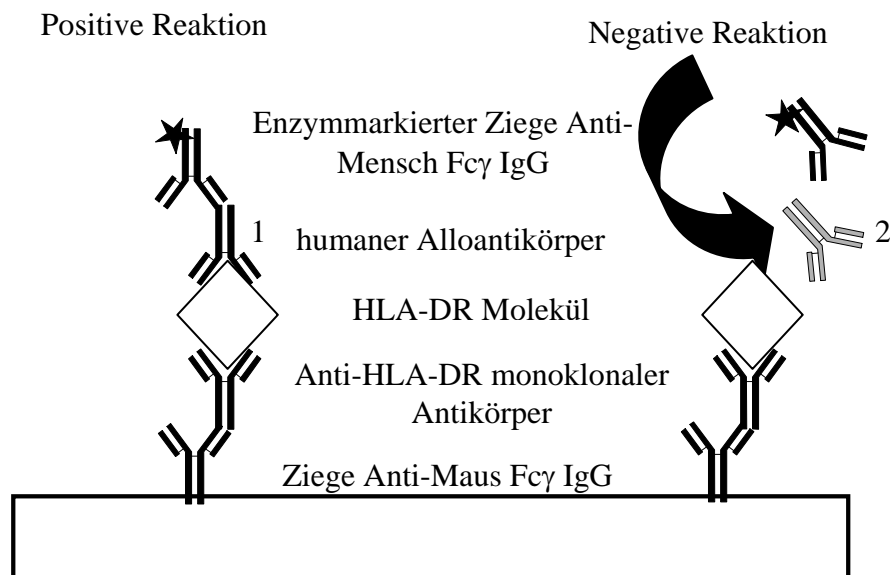
## 4.4 MAILA

### 4.4.1 Testprinzip

Eine festgelegte Anzahl Lymphozyten wird nacheinander mit antikörperhaltigem Patientenserum und dem monoklonalen murinen Antikörper L.243, der gegen die  $\alpha$ -Kette des HLA-DR Moleküls gerichtet ist, inkubiert. Erkennen beide Antikörper Epitope auf dem selben Molekül, so entstehen an der Membran Komplexe bestehend aus Anti-HLA-DR monoklonalem Antikörper, dem HLA-DR Molekül und dem humanen Antikörper. Enthält das Humanserum keine Antikörper, die gegen Epitope auf diesem, vom Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörper gebundenen Molekül gerichtet sind, so entstehen Komplexe, die sich nur aus dem HLA-DR Molekül und Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörper zusammensetzen. Durch sorgfältiges Waschen werden die ungebundenen Serumreste aus der flüssigen Phase entfernt. Nach Solubilisation der Lymphozyten werden die noch verbliebenen Membranreste durch Zentrifu-

gation entfernt. Ein Teil des Überstandes wird verdünnt und in eine Mikrotiterplatte überführt, die mit einem weiteren monoklonalen Antikörper gegen das Fc-Ende muriner IgG-Antikörper (Ziege Anti-Maus IgG (Fc)) beschichtet ist. An dieser Festphase werden deshalb alle Komplexe, die aus Anti-HLA-DR monoklonalem Antikörper und dem HLA-DR Molekül bestehen, festgehalten, unabhängig ob auch ein humaner Antikörper gebunden ist. Durch Hinzupettieren einer geeigneten Verdünnung eines enzymmarkierten monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$ -Antikörpers kann man selektiv alle immobilisierten Komplexe, die aus Anti-HLA-DR monoklonalem Antikörper, dem HLA-DR Molekül und dem humanen Antikörper bestehen, quantifizieren. Das Testprinzip ist in Abbildung 4 dargestellt.

**Abbildung 4: Testprinzip des MAILA nach (44)**



<sup>1</sup> HLA-DR spezifischer humaner Allo-Antikörper; <sup>2</sup> HLA-DR unspezifischer humaner Allo-Antikörper

#### 4.4.2 Puffer und Lösungen

*Coating-Puffer:* 1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g NaN<sub>3</sub> wurden in einem Glasgefäß mit 1000 ml aqua dest durch Schwenken gelöst. Der Puffer musste einen pH von 9,6 aufweisen und war bei + 4°C 14 Tage haltbar.

*PBS/2% BSA:* Man mischte 100  $\mu$ l BSA mit 4900  $\mu$ l PBS. Die Lösung wurde zum sofortigen Gebrauch angesetzt.

TRIS-Waschpuffer: 1,21 g TRIS wurden in 1000 ml NaCl 0,9% gelöst. Nachdem der pH-Wert dieser Lösung mit 3 M HCl auf 7,4 eingestellt worden war, wurden 5 ml Triton X 100, und je 0,5 ml Tween 20 und 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde bei +4°C aufbewahrt.

1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 21,9 g CaCl<sub>2</sub> wurden in 100 ml aqua dest gelöst. Die Lösung wurde bei +4°C aufbewahrt und war 6 Monate haltbar.

TRIS-Solubilisationspuffer: 1,21 g TRIS wurden in 1000 ml NaCl 0,9% gelöst. Nachdem der pH-Wert dieser Lösung mit 3M HCl auf 7,4 eingestellt worden war, fügte man 5 ml Triton X 100 hinzu. Der Puffer wurde bei +4°C aufbewahrt.

Lösung des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers L.243: Man stellte eine  $6,25 \times 10^{-4}$  g/l konzentrierte Lösung des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers in PBS/2% BSA her. Die Lösung wurde in Einmal-Teströhrchen aus Glas (75 x 12 x 0,6 mm) angesetzt und war für den sofortigen Gebrauch vorgesehen.

Lösung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörpers: Unmittelbar vor Gebrauch wurde im Dunkeln eine 1:2000-Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörpers in Einmal-Teströhrchen aus Glas (75 x 12 x 0,6 mm) angesetzt.

Substratlösung: In einem Polyröhrchen wurden 2 Tabletten OPD in 6 ml aqua dest gelöst und 2,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Lösung wurde nur zum sofortigen Gebrauch und im Dunkeln angesetzt.

2,5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 27,8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% wurden zu 372,2 ml aqua dest. gegeben. Die Verdünnung war in einer Glasflasche mit Schraubverschluss bei Raumtemperatur 3 Monate haltbar.

#### 4.4.3 Durchführung

Am Vortag wurde die ELISA-Mikrotiterplatte vorbereitet: Dazu wurden die benötigten Vertiefungen der Platte mit je 100 µl einer 1:500 verdünnten Lösung des monoklonalen Ziege Anti-Maus Fcγ Antikörpers in *Coating*-Puffer beschickt. Die Platte wurde sodann bei +4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die fixierten Zellen zunächst eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das *Pellet* in 120 µl PBS/2% BSA resuspendiert. Es wurden je 30 µl dieser Zellschlösung in vorbereitete Eppendorf-Zentrifugierröhrchen überführt, so dass für den folgenden Inkubationsschritt  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Reaktionsansatz vorgegeben wurden. Zur Zellschlösung wurden jeweils 10 µl des zu untersuchenden Serums pipettiert. Die Ansätze wurden sodann 30 Minuten lang bei +37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein Waschschriff: In jedes Zentrifugierröhrchen wurden 100 µl NaCl 0,9% gegeben. Das Gemisch wurde bei 8000 x g 1 Minute lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das *Pellet* wiederum in 30 µl PBS/2% BSA resuspendiert. Nun wurden je 20 µl der Lösung des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers hinzugegeben. Es folgte eine weitere halbstündige Inkubationszeit bei +37°C im Brutschrank.

Hierauf folgten drei weitere Waschschriffe. Nach dem dritten Waschschriff wurde das *Pellet* in 100 µl TRIS-Solubilisationspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zentrifugierröhrchen für 5 Minuten in das Solubilisationsbad gestellt. Hierauf schloss sich eine Zentrifugation bei 13000 x g für 30 Minuten bei +4°C an. Während dieses Zentrifugationsschrittes wurde die am Vorabend vorbereitete Platte viermal gewaschen. Ein Waschschriff lief dabei folgendermaßen ab: Die in den Vertiefungen verbliebene Lösung wurde verworfen, die Platte auf Zellstofftüchern trocken geschlagen und anschließend mit 200 µl TRIS-Waschpuffer pro Vertiefung befüllt. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Platte mit 200 µl TRIS-Waschpuffer pro Vertiefung befüllt und mindestens 25 Minuten bei +4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

50 µl des Überstandes des zentrifugierten Solubilisats wurde in mit 200 µl TRIS-Waschpuffer befüllte Eppendorf-Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert. Von dieser Verdünnung wurden daraufhin zweimal je 100 µl entnommen und in zwei Vertiefungen der vorab trocken geschlagenen Platte eingebracht. Die Platte wurde daraufhin 90 Minuten bei +4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte viermal gewaschen. Schließlich wurde jede Vertiefung der trockenen Platte mit je 100 µl einer 1:2000 verdünnten Lösung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fcγ Antikörpers in TRIS-Waschpuffer beschickt. Es schloss sich eine weitere Inkubationszeit von 120 Minuten bei +4°C an.

Daraufhin wurde die Platte fünfmal gewaschen. Die trockene Platte wurde sodann mit je 100 µl der Substratlösung pro Vertiefung befüllt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Vertiefung gestoppt und die Extinktion des in jeder einzelnen Plattenvertiefung enthaltenen Ansatzes im Photometer gemessen.

Auswertung:

Zur Ermittlung des Versuchsergebnisses wurde zunächst das arithmetische Mittel der vier Leerwerte, die pro Platte mitgeführt wurden, errechnet. Dieser Wert wurde vom arithmetischen Mittel der Extinktionswerte entsprechender Doppelansätze abgezogen. Diese Differenz, die wiederum die Dimension eines Extinktionswertes hatte, wurde als Versuchsergebnis verwendet.

### 4.4.4 Methodische Voruntersuchungen

#### 4.4.4.1 Optimierung der Testbedingungen des MAILA

##### 4.4.4.1.1 Bestimmung der optimalen Konzentration des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers L.243

Um die optimale Konzentration des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers zu ermitteln, wurde die Extinktion des Ansatzes der Zelllinie MGAR (B8, DR2) mit den Seren

MUE 1325 II (Anti-B8), MUE 20407 (Anti-DR2), MUE 23169 (Anti-B8, 14, w39, -DR2, 3) und AB-Serum bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers und ansonsten konstant gehaltenen Bedingungen gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Ermittlung der optimalen Konzentration des HLA-DR monoklonalen Antikörpers L.243**

Verdünnung des Anti-HLA-DR mo- noklonalen Antikör- pers	OD der Ansätze von MGAR (B8, DR2) mit			
	MUE 1325 II (Anti-B8)	MUE 20407 (Anti-DR2)	MUE 23169 (Anti-B8, 14, w39, -DR2, 3)	AB-Serum
1:5	0,151	2,000	0,461	0,032
1:10	0,138	1,794	1,673	0,055
1:20	0,060	1,841	1,117	0,036
1:40	0,094	1,906	1,574	0,054
1:80	0,113	0,421	0,562	0,022
1:160	0,048	0,153	0,201	0,048

Ab einer Konzentration des Anti-HLA-DR monoklonalen Antikörpers von 1:40 nimmt die Extinktion keiner der beiden Positivkontroll-Ansätze mehr zu. Die Negativkontroll-Ansätze ergaben zuverlässig negative Extinktionen. Bei den Messungen des Patientenmaterials wird der Anti-HLA-DR monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 1:40 eingesetzt, da die Extinktionen positiver Reaktionen ausreichend deutlich ausfallen.

#### 4.4.4.1.2 Bestimmung der benötigten Menge an humanem Serum

Zur Ermittlung des benötigten Volumens Serum pro Ansatz wurden die Zelllinien MGAR (DR2) und SAVC (DR4) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Positivkontroll-Seren ausgetestet. Alle anderen Testbedingungen wurden konstant gehalten und entsprachen denjenigen, die später bei Testung der Patientenseren eingehalten wurden. Die Testergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.



**Tabelle 5: Bestimmung des im MAILA benötigten Volumens an Patientenserum**

Eingesetztes Volumen des jeweiligen Positivkontroll- Serums	MGAR (DR2) mit MUE 20407 (Anti-DR2)	SAVC (DR4) mit P 50 (Anti- DR4, 5)
5 µl	0,906	0,811
10 µl	2,000	1,070
20 µl	0,437	1,524
40 µl	2,000	1,092

Alle Positivkontroll-Seren reagieren positiv. Setzt man 5 µl ein, liegen die Extinktionen etwa viermal, für 10 µl fünf- (SAVC) bis zehnmal (MGAR) so hoch wie der ermittelte *Cut-off*-Wert (s. 4.4.4.3). Um eine möglichst deutliche Diskriminierung positiver Seren treffen zu können, gleichzeitig aber sparsam mit dem nur in begrenztem Volumen vorliegenden Untersuchungsmaterial umzugehen, entschieden wir uns, 10 µl Patientenserum in den Tests einzusetzen.

#### 4.4.4.1.3 Bestimmung der optimalen Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$ Antikörpers

Es wurden Verdünnungsreihen des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$ Antikörpers angelegt und bei konstanten übrigen Bedingungen ausgetestet, um herauszufinden, bei welcher Konzentration dieses Antikörpers eine optimale Differenzierung positiver und negativer Befunde zu erwarten ist.

Dazu wurde die Zelllinie MGAR (DR2) mit Serum MUE 2959 (Anti-DR3, 4, 7), Serum MUE 18914 (Anti-B7, -DR 2, 6) und AB-Serum getestet. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle 6 angegeben.

**Tabelle 6: Bestimmung der optimalen Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörpers**

Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$ Antikörpers	AB-Serum	OD	
		MUE 2959	MUE 18914
1:100	1,072	1,343	2,000
1:500	0,237	0,724	1,554
1:1000	0,092	0,386	2,000
1:2000	0,136	0,088	1,290
1:5000	0,050	0,080	0,314
1:10000	0,123	0,039	0,358
1:20000	0,131	0,117	0,094

Die Negativ-Kontrolle und Serum MUE 2959 wurden ab einer Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörpers < 1:1000 zuverlässig als negativ getestet. Serum MUE 18914 wurde als Positiv-Kontrolle bis zu einer Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörpers von 1:10000 als positiv getestet. Da der quantitative Unterschied in der Extinktionshöhe zwischen Negativ- und Positiv-Kontrollen bei einer Verdünnung von 1:2000 am deutlichsten war, wurde der monoklonale Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$  Antikörper in den folgenden Tests in dieser Verdünnung eingesetzt.

#### 4.4.4.2 Bestimmung der Negativ-Kontrollen

Als Negativ-Kontrollen wurden Seren männlicher Blutspender mit der Blutgruppe AB eingesetzt.

#### 4.4.4.3 Bestimmung des Negativ-Positiv-Cut-off

Als Negativ-Positiv-Cut-off legten wir die 97,5%-Perzentile der Extinktion von 152 Negativ-Kontrollen fest. Diese betrug 0,208. Somit wurde jeder Extinktionswert größer oder gleich 0,208 als positiv bewertet. Bei der Untersuchung der Patientenseren galt ein Ansatz als positiv, wenn er in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Tests eine Extinktion von 0,208 oder mehr erreichte.

#### 4.4.4.4 Bestimmung der Positiv-Kontrollen

Mehrere im Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität vorliegende humane Allo-Antiseren wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Positiv-Kontroll-Seren für die Verwendung im MAILA getestet. Als geeignet wurden solche Seren angesehen, die in mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Tests positive Extinktionswerte ergaben.

### 4.5 Vergleich der Sensitivität zwischen dem Mikro-Lymphozytenzytotoxizitätstest (LCT) und dem MAILA

Als Goldstandard bei der Detektion von HLA-Antikörpern gilt der LCT nach TERASAKI und McCLELLAND (40). Um die Sensitivität des von uns angewandten Testverfahrens bestimmen zu können, verglichen wir diese mit der des LCT. Hierzu testeten wir unterschiedlich stark verdünnte, humane Allo-Antiseren bekannter Spezifität mit frisch isolierten B-Lymphozyten von drei freiwilligen Spendern sowohl im LCT als auch im MAILA. Die B-Lymphozyten wurden, bevor sie im MAILA eingesetzt wurden, wie unter 4.3.4 beschrieben fixiert. Die Antiseren wurden vor ihrem Einsatz dreimal mit Thrombozyten absorbiert, um HLA-Klasse I-Antikörper als potentielle Quelle falsch positiver Befunde zu eliminieren. Der MAILA wurde nach dem unter 4.4.3 angegebenen Protokoll durchgeführt, der LCT nach der im folgenden ausgeführten Vorgehensweise.

#### 4.5.1 Isolierung von B-Lymphozyten aus peripheren venös entnommenem Blut

Prinzip:

Nach Isolierung der Lymphozyten aus mit ACD versetztem Vollblut werden die B-Lymphozyten an paramagnetische *beads* (Dynabeads®) gebunden, die mit monoklonalen Antikörpern gegen B-Zell-Determinanten beschichtet sind. Mit Hilfe eines Magneten werden die an die *beads* gebundenen B-Zellen aus der Gesamtheit der Lymphozyten abgetrennt.

Lösungen:

PBS + Natriumcitrat: 6 g Natriumcitrat wurden in 1000 ml PBS gelöst. Es wurde ein pH von 7,25 eingestellt.

PBS + 5% FCS: 50 µl FCS wurden in 950 µl PBS verdünnt.

Durchführung:

10 ml Blut der freiwilligen Spender wurden in mit je 1,5 ml ACD befüllte Rundboden-Zentrifugierröhrchen aufgenommen und 5 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abpipettiert und verworfen, der die Lymphozyten enthaltende *Buffy-coat* in Einmal-Teströhrchen aus Glas überführt und mit 8 ml PBS + Natriumcitrat aufgefüllt.

Nachdem man die Dynabeads® durch Schwenken vorsichtig gemischt hat, wurden 100 µl der Dynabeads®-Lösung zu den Lymphozyten pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und 5 Minuten im Eiswasserbad inkubiert. Anschließend wurde er für 2 Minuten bei Raumtemperatur im Magnethalter inkubiert. Der Inhalt des Röhrchens wurde abgegossen, wobei das Röhrchen im Magnethalter verblieb. Darauf wurde es aus dem Magnethalter genommen und die am Röhrchenrand haftenden, an die Dynabeads® gekoppelten B-Lymphozyten mit ca. 5 ml PBS + Natriumcitrat an der Innenwand heruntergespült und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde auf diese Weise viermal gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die am Röhrchenrand haftenden Zellen mit ca. 2 ml PBS heruntergespült und mithilfe des Magneten am Boden des Röhrchens zu einem *Pellet* konzentriert. Der restliche Überstand wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zellen in 0,2 ml PBS + 5% FCS resuspendiert.

#### 4.5.2 Thrombozytenabsorption

Lösungen:

Die Thrombozyten wurden aus abgelaufenen Thrombozyten-Konzentraten gewonnen und, in einer Nährlösung suspendiert, bei +4°C aufbewahrt.

Durchführung:

20 µl Serum wurden mit 120 µl der auf eine Zellzahl von  $10^9$ /ml in NaCl 0,9% eingestellten Thrombozyten-Lösung auf dem Mini-Schüttler gemischt und anschließend 30 Minuten bei +37°C im Rüttelwasserbad bei mittlerer Rotation inkubiert. Danach wurden die Ansätze 3 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf diese Weise noch zwei weitere Male absorbiert.

Um noch verbliebene zelluläre Bestandteile zu entfernen, wurde der Überstand nach dem dritten Absorptionsschritt erneut 3 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Der letzte Überstand konnte im LCT oder MAILA eingesetzt oder bei -80°C eingefroren werden.

#### 4.5.3 Lymphozytenzytotoxizitätstest (lymphocyte cytotoxicity test, LCT)

Prinzip:

Zellen, Serum und Komplement werden in Vertiefungen einer geölten TERASAKI-Platte inkubiert. Befinden sich im Serum Immunglobuline der Klassen G oder M, die spezifisch an Oberflächenantigene auf den Zellen binden, kommt es durch nachfolgende Aktivierung des Komplements zur Lyse dieser Zellen, welche dadurch selektiv anfärbbar werden. Anhand des Anteils angefärbter Zellen pro Vertiefung kann abgeschätzt werden, ob eine Zell-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat. Auf diese Weise kann man bei bekannter Spezifität der Antikörper Antigene auf Zellen nachweisen beziehungsweise bei bekannten zellulären Antigenen die Spezifität von Antikörpern erkennen.

Lösungen:

EB/AO (Ethidiumbromid/Acridin-Orange-Lösung): 50 mg Ethidiumbromid und 15 mg Acridin-Orange wurden in 1 ml Ethanol 95% und 49 ml PBS gelöst und 10 Minuten bei 700 x g abzentrifugiert. Vor Licht geschützt bei -20°C eingefroren blieb diese Lösung 6 Monate haltbar.

EDTA 5%: 50 g EDTA wurden in 1000 ml NaCl 0,9% gelöst. Die Lösung wurde auf pH 7,25 eingestellt.

Tusche Lösung 10%: 1 ml Tusche (Fa. Schmincke, Erkrath) wurde in 9 ml PBS verdünnt und 10 Minuten bei 700 x g abzentrifugiert.

Alle Lösungen mussten auf +4°C temperiert ein.

#### Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden mit Hilfe des automatischen Beölungsgärts mit jeweils 10 µl Paraffinöl pro Vertiefung beschickt. Je 1 µl Serum und B-Zellsuspension wurden mit der Hamilton-Pipette in jede Vertiefung der geölten Mikrotiterplatte pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Pro Vertiefung wurden 3 µl des nach den Herstellerangaben gelösten Kaninchenkomplements und unmittelbar anschließend 3 µl EB/AO hinzugefügt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 35 Minuten inkubiert. Danach wurden 6 µl der 1:60 in EDTA 5% verdünnten Tusche-Lösung pro Vertiefung zugefügt.

Die Platten wurden mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops bei 100facher Vergrößerung abgelesen. Es wurde der Anteil der lysierten, rot gefärbten Zellen an der Gesamtzahl der in der Vertiefung befindlichen Zellen bestimmt. Überstieg das Verhältnis letal geschädigter Zellen zur Gesamtzahl der Zellen pro Vertiefung 21%, wurde der Ansatz als positiv gewertet.

## 4.6 Untersuchung der Spezifität des MAILA

#### Prinzip:

Um zu bestimmen, ob im MAILA nachgewiesene Antikörper spezifisch gegen HLA-DR Allo-Antigene gerichtet waren, absorbierten wir 2 Seren, die im MAILA positiv reagiert hatten, mit B-Zelllinien und testeten die Seren danach erneut. Beide Seren enthielten Antikörper gegen jeweils 2 HLA-DR Spezifitäten. Sollte bei der auf die Absorption folgenden Auswertung der Seren im MAILA die Reaktivität eines Serums gegen eine B-Zelllinie nach Absorption mit Zellen der selben Zelllinie nicht mehr nachweisbar sein, so war davon auszugehen, dass die im MAILA nachgewiesenen Antikörper spezifisch für die HLA-DR Merkmale waren. Die selbe Schlussfolgerung ergab sich, wenn die Reaktivität eines Serums gegen eine B-Zelllinie nach Absorption mit Zellen einer anderen Zelllinie nicht aufgehoben wurde.

#### Lösungen:

PBS/1% BSA: 1 ml BSA wurde in 99 ml PBS verdünnt.

#### Durchführung:

Die fixierten Zelllinien wurden 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das *Pellet* in 40 µl PBS/1% BSA resuspendiert. 10 µl dieser Zellschlösung (entsprach  $0,5 \times 10^6$  Zellen) wurden mit 10 µl Serum in Eppendorf-Zentrifugierröhrchen 30 Minuten bei +37°C im Thermomixer inkubiert und danach 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues mit 10 µl Zellschlösung befülltes Zentrifugierröhrchen überführt und 30 Minuten bei +37°C im Thermomixer inkubiert. Hiernach schloss sich erneut eine Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 x g an. 20 µl Überstand wurden in den letzten Absorptionsschritt eingebracht, welcher wie die beiden vorhergehenden ablief.

Der MAILA wurde wie unter 4.4.3 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der 10 µl Serum 20 µl aus dem letzten Absorptionsschritt hervorgegangener Überstand in den MAILA eingebracht wurden. Nicht absorbierte Positiv- und Negativkontroll-Seren wurden wie das auszutestende Serum verdünnt.

## 4.7 Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Patientencharakteristika

Die Zusammensetzung der Gruppen hinsichtlich für die Beurteilung der Testergebnisse wichtiger Daten ist in den Tabellen 7 bis 9 dargestellt.

**Tabelle 7: Patientencharakteristika**

Merkmal	Gruppe A (n = 20) <sup>a</sup>	Gruppe B (n = 13) <sup>a,b</sup>	Kontrollgruppe (n = 20) <sup>b</sup>
Alter (Jahre)			
Median	55	43	45,5
Spannweite	33 – 72	23 – 58	25 – 59
<i>Panel</i> -Reaktivität (n) <sup>c</sup>			
0-5%	16	11	19
> 5%	4	2	1
Tag der Rejektion (d)			
Median	14,5	1075	– <sup>d</sup>
Spannweite	5 – 39	300-2940	– <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Patient #16 wurde sowohl in Gruppe A als auch B eingeschlossen

<sup>b</sup> Patient #24 wurde sowohl in der Kontrollgruppe als auch Gruppe B eingeschlossen.

<sup>c</sup> Maximale *Panel*-Reaktivität während des letzten Jahres vor Transplantation.

<sup>d</sup> Keine Rejektion innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation.

Bei Patienten, die ihr Transplantat abstießen, lag signifikant häufiger ein HLA-DR-*mismatch* zwischen Spender und Empfänger vor ( $p < 0,04$  für Gruppe A versus Kontrollgruppe;  $p < 0,05$  für Gruppe B versus Kontrollgruppe). In der Tabelle 8 ist die Aufteilung der Patienten mit HLA-DR *mismatches* auf die drei Gruppen wiedergegeben.



**Tabelle 8: HLA-DR mismatches in den drei Untersuchungsgruppen**

DR-mismatch (ja/nein)	Gruppe A (n = 20)	Gruppe B (n = 13)	Kontrollgruppe (n = 20)
Nein	11	7	17
Ja	9	6	3

$p = P(\chi^2 (df = 1) \geq \chi_{\text{err}})$  mit  $\chi_{\text{err}} \approx 4,29 < 0,04$  für Gruppe A vs. Kontrollgruppe

$p = P(\chi^2 (df = 1) \geq \chi_{\text{err}})$  mit  $\chi_{\text{err}} \approx 3,86 < 0,05$  für Gruppe B vs. Kontrollgruppe

Auch der Unterschied in der Geschlechterverteilung zwischen den Patienten mit akuter oder chronischer Abstoßung und der Kontrollgruppe war statistisch signifikant: Männer fanden sich häufiger in den Gruppen A oder B als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,02$ ). Die Verteilung von Männern und Frauen auf die drei Gruppen ist in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Geschlechterverteilung: Patienten mit Abstoßung vs. Patienten in Kontrollgruppe**

Geschlecht	Gruppe A + Gruppe B (n = 34)	Kontrollgruppe (n = 20)
Frauen	9/13,1 <sup>a</sup>	12/7,9
Männer	24/19,9	8/12,1

$p = P(\chi^2 (df = 1) \geq \chi_{\text{err}})$  mit  $\chi_{\text{err}} \approx 5,57 < 0,02$

<sup>a</sup> Kursiv: erwartete Werte

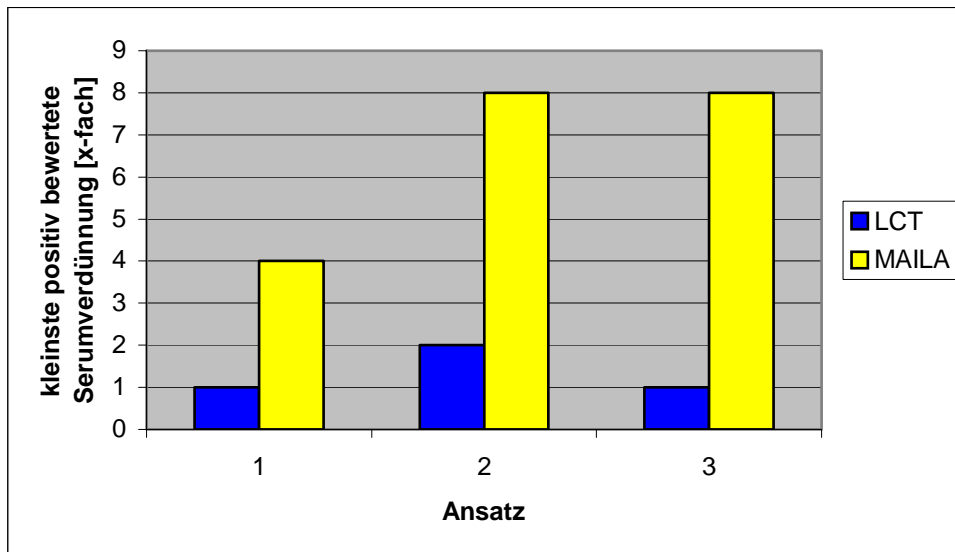
Kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand hinsichtlich der PRA während des letzten Jahres vor Transplantation und akuter oder chronischer Abstoßung.

## 5.2 Vergleich der Sensitivität von LCT und MAILA

Um die Sensitivität des MAILA vergleichend einordnen zu können, wurden HLA-DR spezifische, mit Thrombozyten absorbierte Antiseren in unterschiedlichen Verdünnungen sowohl im MAILA als auch im LCT gegen typisierte frisch isolierte B-Zellen freiwilliger Spender getestet.

Die Ergebnisse des Experiments sind in der Abbildung 5 dargestellt.

**Abbildung 5: Vergleich der Sensitivitäten von LCT und MAILA**



Ansatz 1: Antiserum: Anti-DR2, 8; Testzelle: HLA-DR2,11

Ansatz 2: Antiserum: Anti-DR7; Testzelle: HLA-DR7, 8

Ansatz 3: Antiserum: Anti-DR4; Testzelle: HLA-DR15, 4

Während im LCT positive Reaktionen unterhalb zweifacher Verdünnungen nicht mehr nachweisbar waren, detektierten wir mit dem MAILA Reaktivität bis zu einer achtfachen Serumverdünnung.

Somit erwies sich der MAILA als dem LCT in der Sensitivität überlegen.

### 5.3 Ermittlung der Spezifität des MAILA

Um zu ermitteln, ob die in der Untersuchung der Patientenseren gefundenen Antikörper spezifisch für HLA-DR Allo-Antigene waren, testeten wir 2 Seren nach vorhergehender Absorption der Antikörper erneut.

Serum 1 war positiv mit HLA-DR4 und –DR14 getestet worden. Es wurde erstens mit der Zelllinie SAVC (HLA-DR4), zweitens mit der Zelllinie EK (HLA-DR14) und drittens mit einem Gemisch beider absorbiert. Die Überstände der 3 Absorptionen wurden einzeln gegen die Zelllinien SAVC und EK im MAILA getestet.

Die Reaktivität gegen beide HLA-DR Antigene konnte nach Absorption mit der das entsprechende HLA-DR Merkmal exprimierenden Zelllinie nicht mehr nachgewiesen werden. Nach Absorption mit dem Gemisch beider Zelllinien war im MAILA keine Reaktivität mit den beiden Zelllinien nachweisbar. Nach Absorption mit der Zelllinie SAVC wurde der Überstand im MAILA mit der Zelllinie EK positiv getestet. Nach Absorption mit der Zelllinie EK wurde der Überstand im MAILA mit der Zelllinie SAVC negativ getestet.

Serum 2 war positiv getestet worden mit HLA-DR12 und -DR14 exprimierenden Zelllinien. Es wurde nach Absorption mit den Zelllinien HOM2 (HLA-DR1), SAVC (HLA-DR4) und EK (HLA-DR14) gegen die Zelllinie EK im MAILA getestet.

Serum 2 zeigte folgendes Reaktionsmuster: Die Reaktivität gegen HLA-DR14 war nach Absorption mit der Zelllinie EK im MAILA nicht mehr nachzuweisen. Das Serum reagierte nach Absorption mit den Zelllinien HOM2 und SAVC im MAILA jeweils positiv mit der Zelllinie EK.

Die Ergebnisse der Absorption von Serum 1 und Serum 2 sind in Tabelle 10 dargestellt:

**Tabelle 10: Ergebnismuster von Serum 1 (Anti-HLA-DR4 und –DR14 positiv) und Serum 2 (Anti-HLA-DR12 und –DR14 positiv) im MAILA nach Absorption mit den angegebenen Zelllinien**

Antikörper-Spezifität des Serums	Absorption mit HLA- DR	MAILA mit HLA-DR	
		DR4	DR14
Anti-DR4, Anti-DR14	DR4	Negativ	Positiv
	DR14	Negativ	Negativ
	DR4 und DR14	Negativ	Negativ
	Ohne Absorption	Positiv	Positiv
Anti-DR12 Anti-DR14	DR1		Positiv
	DR4		Positiv
	DR14		Negativ
	Ohne Absorption		Positiv

Die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen sind nicht aufgeführt. Alle Positiv-Kontroll-Seren reagierten positiv, alle Negativ-Kontroll-Seren negativ.

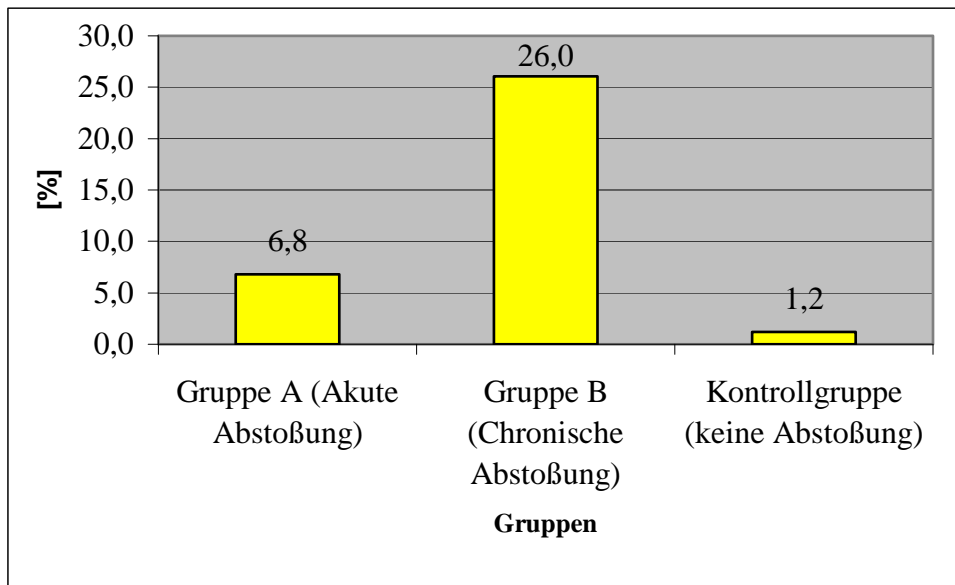
Die Ergebnisse von 8 der insgesamt 9 Ansätze unterstützten die Annahme, dass die im MAILA detektierten Reaktivitäten spezifisch für HLA-DR Merkmale sind.

## **5.4 Prävalenz von HLA-DR Antikörpern in allen untersuchten Seren**

105 Seren wurden jeweils gegen 13 Zelllinien getestet, so dass insgesamt 1365 verschiedene Ansätze untersucht wurden. In Gruppe A wurden 53 Seren getestet (689 Ansätze), in Gruppe B 13 Seren (169 Ansätze) und in der Kontrollgruppe 39 Seren (507 Ansätze).

Von den 1365 Ansätzen wurden 97 positiv getestet (7,1%). Die mittlere Extinktion der positiven Ansätze betrug 0,411 (Spannweite: 0,209 bis 1,426). In Gruppe A wurden 47 von 689 Ansätzen positiv getestet (6,8%), in Gruppe B 44 von 169 (26,0%) und in der Kontrollgruppe 6 der 507 Ansätze (1,2%). Der Unterschied in der Verteilung der positiven Ansätze war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Abbildung 6 zeigt die Aufteilung positiver und negativer Ansätze in den einzelnen Gruppen.

**Abbildung 6: Anteil der HLA-DR Antikörper-positiven Ansätze an den pro Gruppe insgesamt getesteten Ansätzen (in %)**



$p = P(\chi^2 (df = 2) \geq \chi_{\text{err}})$  mit  $\chi_{\text{err}} \approx 33,8 < 0,001$

#### 5.4.1 Prävalenz der HLA-DR Antikörper bei Patienten mit und ohne HLA-DR *mismatch*

Insgesamt erhielten 18 Patienten (9 aus Gruppe A, 6 aus Gruppe B und 3 aus der Kontrollgruppe) die Niere eines Spenders, der nicht HLA-DR identisch war. Bei 11 (5 aus Gruppe A, 5 aus Gruppe B und 1 aus der Kontrollgruppe) dieser 18 Patienten fanden wir Antikörper-positive Seren. 7 Patienten, deren Transplantat ein *mismatch* aufwies, zeigten keine Reaktivität.

Unter den 35 Patienten, deren Niere HLA-DR identisch war, fanden wir 21 ohne (5 aus Gruppe A, 3 aus Gruppe B, 13 aus der Kontrollgruppe) und 14 mit positiv getesteten Seren (6 aus Gruppe A, 4 aus Gruppe B, 4 aus der Kontrollgruppe).

Es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Spender-Empfänger-*mismatch* und Patienten mit HLA-DR Antikörper positiven Seren. In Tabelle 11 ist die Verteilung der Patienten mit HLA-DR Antikörper positiven Seren auf die 3 Untersuchungsgruppen, unterteilt in Patienten mit und ohne HLA-DR *mismatch*, wiedergegeben.

**Tabelle 11: Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne HLA-DR Antikörper positiven Seren und Patienten mit und ohne Spender-Empfänger *mismatch* in den drei Gruppen**

	Gruppe A (Akute Abstoßung)		Gruppe B (Chronische Abstoßung)		Kontrollgruppe (keine Abstoßung)		$\Sigma$
	MM pos. <sup>b</sup>	MM neg. <sup>b</sup>	MM pos.	MM neg.	MM pos.	MM neg.	
Ak pos. <sup>a</sup>	5	6	5	4	1	4	25
Ak neg. <sup>a</sup>	4	5	1	3	2	13	28
$\Sigma$	9	11	6	7	3	17	53

<sup>a</sup> Ak pos. = Anzahl der Patienten mit mindestens einem HLA-DR Antikörper positiven Serum; Ak neg. = Anzahl der Patienten ohne HLA-DR Antikörper positive Seren

<sup>b</sup> MM pos. = Anzahl der Patienten mit Spender-Empfänger *mismatch*; MM neg. = Anzahl der Patienten ohne Spender-Empfänger *mismatch*

#### 5.4.2 Prävalenz der HLA-DR Antikörper vor Nierentransplantation

Die Prävalenz von HLA-DR Antikörpern war nur in Gruppe A und der Kontrollgruppe bestimmbar, da von den Patienten mit chronischer Abstoßung (Gruppe B) kein Prä-TX-Serum vorlag.

In Gruppe A wurden bei 6 Patienten im Prä-TX-Serum HLA-DR Antikörper, in Gruppe B bei 4 Patienten nachgewiesen. Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der Prävalenz von HLA-DR Antikörpern vor Nierentransplantation.

Tabelle 12 zeigt die Verteilung von Patienten mit HLA-DR Antikörpern auf die beiden untersuchten Gruppen.

**Tabelle 12: Darstellung der Prävalenz von nachweisbaren HLA-DR Antikörpern vor der Transplantation**

	Gruppe A (Akute Abstoßung)	Kontrollgruppe (Keine Abstoßung)	$\Sigma$
Prä-TX Ak pos. <sup>a</sup>	6	4	10
Prä-TX Ak neg. <sup>a</sup>	14	16	30
$\Sigma$	20	20	40

<sup>a</sup> Prä-TX-Ak pos. = Anzahl der Patienten mit mindestens einem HLA-DR Antikörper positiven Prä-TX-Serum;  
 Prä-TX-Ak neg. = Anzahl der Patienten ohne HLA-DR Antikörper positive Prä-TX-Seren

#### 5.4.3 Prävalenz von HLA-DR Antikörpern nach Stratifizierung für Geschlecht

Bei 15 Männern und 10 Frauen fanden wir HLA-DR Antikörper, bei 17 Männern und 11 Frauen nicht. Es bestand damit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Patienten mit HLA-DR Antikörper-positiven Seren und Geschlechtszugehörigkeit, weder bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv, noch bezogen auf die einzelnen Gruppen. Die Tabelle 11 zeigt die Verteilung der Patienten mit HLA-DR Antikörper-positiven Seren auf weibliche und männliche Patienten der 3 Untersuchungsgruppen.

**Tabelle 13: Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne HLA-DR Antikörper-positiven Seren nach Geschlecht stratifiziert**

	Gruppe A		Gruppe B		Kontrollgruppe		$\Sigma$
	w <sup>b</sup>	m <sup>b</sup>	w	m	w	m	
Ak pos. <sup>a</sup>	6	5	6	3	3	2	25
Ak neg. <sup>a</sup>	8	1	4	0	5	10	28
$\Sigma$	14	6	10	3	8	12	53

<sup>a</sup> Ak pos. = Anzahl der Patienten mit mindestens einem HLA-DR Antikörper-positiven Serum; Ak neg. = Anzahl der Patienten ohne HLA-DR Antikörper-positive Seren

<sup>b</sup> w = Anzahl der Frauen; m = Anzahl der Männer

## 5.5 Spezifität der nachgewiesenen HLA-DR Antikörper

Die in den Seren der Patienten in den verschiedenen Gruppen gefundenen Antikörper-Spezifitäten zeigt Tabelle 14. Eine tabellarische Übersicht über alle Patienten findet sich im Anhang.

**Tabelle 14a: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Gruppe A (Akute Abstoßung)**

Patient #	HLA-DR MM <sup>a</sup>	1. Serum	2. Serum	3. Serum
10	Nein			DR1
11	Nein			DR1 <sup>c</sup> , 17, 4, 7
12	Nein	DR13	DR4, 14	Nicht untersucht
13	Nein	DR15	DR14	
14	Nein		DR15	DR16
15	Nein	DR1, 15, 16, 9	DR1, 15, 16, 17, 18, 4, 7, 9	DR1, 15, 16, 17, 18
16	Ja (DR13)	DR17, 12, 13 <sup>b</sup>		
17	Ja (DR11)		DR8	
18	Ja (DR13)	DR1		DR15
19	Ja (DR1, 13)		DR18	DR12, 7, 9
20	Ja (DR15, 17)	DR16, 4, 11, 14	DR12, 14	DR15, 13

**Tabelle 14b: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Gruppe B (Chronische Abstoßung)**

Patient #	HLA-DR MM	Untersuchtes Serum
45	Nein	DR12
24	Nein	DR17, 18, 13
46	Nein	DR15, 17, 12, 13, 9
47	Nein	DR15, 16, 17, 18, 4, 11, 12, 13, 14, 7, 8, 9
16	Ja (DR13)	DR7
48	Ja (DR17, 11)	DR4, 11, 14
49	Ja (DR12)	DR12, 13, 8
50	Ja (DR5, 7)	DR16, 17, 18, 8, 9
51	Ja (DR17)	DR1, 16, 17, 18, 4, 11, 12, 14, 7, 8, 9



**Tabelle 14c: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Kontrollgruppe (Keine Abstoßung)**

Patient #	HLA-DR MM	1. Serum	2. Serum
36	Nein		DR1
37	Nein	DR12	
38	Nein	DR12, 14	
39	Nein	DR1	
40	Ja (DR1)	DR8	

<sup>a</sup> HLA-DR MM: Spender-Empfänger-*mismatch* auf dem HLA-DR Locus

<sup>b</sup> rot: HLA-DR Antikörper, die spezifisch für ein Spender-Empfänger-*mismatch* waren

<sup>c</sup> hellgrün: HLA-DR Antikörper, die spezifisch für ein HLA-DR Merkmal des Empfängers waren.

### 5.5.1 Aufteilung von monospezifischen und polyspezifischen Seren

In 34 der 105 getesteten Seren fanden wir HLA-DR Antikörper. 16 der 34 Seren reagierten nur mit einer Zelllinie, während 18 mit mehreren im Median mit 3,5 (Spannweite: 2 – 12) Zelllinien, reaktiv waren. Alle bis auf eines der polyspezifischen Seren stammten aus den Gruppe A oder B. Die Verteilung von mono- und polyspezifischen Seren auf die einzelnen Gruppen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

### 5.5.2 Zusammenhang zwischen HLA-DR *mismatch* und Antikörper-Spezifität

18 Patienten wiesen ein Spender-Empfänger-*mismatch* auf dem HLA-DR Locus auf. Bei 11 von diesen Patienten (jeweils 5 Patienten aus Gruppe A und B und 1 Patient aus der Kontrollgruppe) fanden wir HLA-DR Antikörper, bei 7 (4 aus Gruppe A, 1 aus Gruppe B, 2 aus der Kontrollgruppe) nicht. Bei 6 der 11 Patienten mit HLA-DR-*mismatch* und positivem Nachweis von HLA-DR Antikörpern (3 aus Gruppe A, 2 aus Gruppe B, 1 aus der Kontrollgruppe) wiesen wir Antikörper nach, die für das HLA-DR-*mismatch* nicht spezifisch waren. Bei 5 der 11 Patienten (2 aus Gruppe A, 3 aus Gruppe B) konnten Antikörper nachgewiesen werden, die gegen das Allo-Antigen des Spenders gerichtet waren. In Tabelle 14 erkennt man diese 5 Patienten mit den nachgewiesenen HLA-DR Antikörper-Spezifitäten und dem HLA-DR *mismatch* an der roten Markierung.

Die 9 Patienten aus Gruppe A, 6 Patienten aus Gruppe B und 3 Patienten aus der Kontrollgruppe, die ein Spender-Empfänger-*mismatch* auf dem HLA-DR Locus aufwiesen, unter-

schieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Bildung von Antikörpern ( $P \approx 0,42$ ). In Tabelle 15 erkennt man die Verteilung von Antikörpern auf die 18 Patienten mit HLA-DR inkompatiblem Transplantat unterteilt in Patienten mit akuter und chronischer Abstoßung und Patienten ohne Abstoßung.

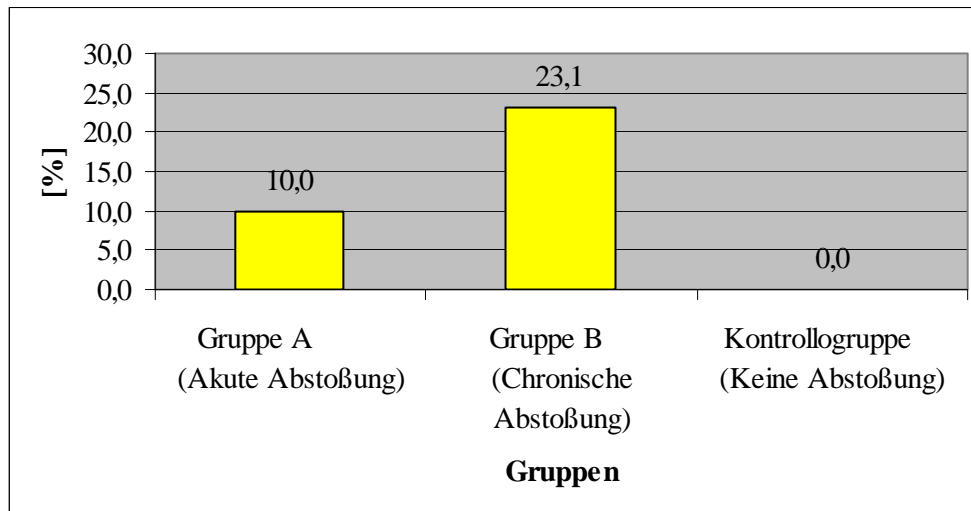
**Tabelle 15: Zusammenhang der Prävalenz und Spezifität von HLA-DR Antikörpern und dem klinischen Schicksal des Transplantats bei Patienten mit HLA-DR inkompatiblem Transplantat**

	MM-Ak <sup>a</sup>	Ak <sup>a</sup>	Ø Ak <sup>a</sup>	Σ
Gruppe A (Akute Abstoßung)	2	3	4	9
Gruppe B (Chronische Abstoßung)	3	2	1	6
Kontrollgruppe	0	1	2	3
Σ	5	6	7	18

<sup>a</sup> MM-Ak: *mismatch*-spezifische Antikörper; Ak: *mismatch*-unspezifische Antikörper; Ø Ak: keine Antikörper

Alle 5 Patienten mit HLA-DR *mismatch*-spezifischen Antikörpern stießen ihr Transplantat ab. Die Verteilung des Anteils der Patienten pro Gruppe mit *mismatch*-spezifischen Antikörpern auf die 3 Gruppen war statistisch signifikant ( $P \ll 0,001$ ). In Abbildung 7 wird der jeweilige Anteil der Patienten mit *mismatch*-spezifischen Antikörpern pro Gruppe dargestellt.

**Abbildung 7: Anteil der Patienten mit Nachweis *mismatch*-spezifischer HLA-DR Antikörper pro Gruppe**



$p = P(\chi^2 (df = 2) \geq \chi_{\text{err}})$  mit  $\chi_{\text{err}} \approx 27,3 \ll 0,001$

### 5.5.3 Prävalenz von Antikörpern gegen HLA-DR Antigene des Empfängers

In insgesamt 9 Fällen fanden wir Antikörper, die gegen HLA-DR Merkmale des Empfängers gerichtet waren. In Tabelle 14 sind diese Antikörper durch eine hellgrüne Färbung hervorgehoben.

Die Durchführung von autologen Gewebeverträglichkeitsproben, die zur Klärung der Frage, ob es sich bei diesen Antikörpern um echte Auto-Antikörper handelt, notwendig gewesen wären, erwies sich als nicht möglich, da keine Gewebeproben des Empfängers verfügbar waren.

## 6 Diskussion

### 6.1 MAILA als Methode zur Detektion von HLA-DR Antikörpern

Die Bedeutung von HLA-DR Antikörpern für die akute und chronische Abstoßung von Nierentransplantaten ist unklar. Seit den 70er Jahren befassten sich mehrere Untersucher mit dieser Fragestellung. Sie gelangten zu verschiedenen, zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Als eine wichtige Ursache dieser Diskrepanz kann die unterschiedliche Aussagekraft und Spezifität der angewandten Untersuchungsmethoden angesehen werden.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, wurden zur Suche nach HLA-Antikörpern vor allem drei Verfahren eingesetzt: Der Mikro-Lymphozytotoxizitätstest, die Durchflußzytometrie und ELISA. Zu diesen Methoden wurden seit ihrer Erstbeschreibung unterschiedliche Varianten entwickelt, die aber das zugrunde liegende Testprinzip unverändert ließen.

Der Mikro-Lymphozytotoxizitätstest beruht auf der Fähigkeit bestimmter Immunglobulin-Klassen, Komplement zu aktivieren. Komplement führt zur Lyse der Zellen, an deren Oberflächenmerkmale Antikörper gebunden haben. Ein Untersucher kann über die Diskrimination von lysierten und intakten Zellen solche Zellen bestimmen, an die Antikörper gebunden haben. Kennt er die Spezifität der Antigene dieser Zellen, kann er Rückschlüsse auf die Spezifität der Antikörper ziehen.

Sensitivität und Spezifität dieses Tests werden allerdings durch eine Vielzahl von Fehlerquellen herabgesetzt. Die Sensitivität des LCT wird durch folgende Faktoren gemindert:

- Spezifische HLA-Antikörper, die kein Komplement aktivieren, werden nicht detektiert.
- Seren, die spezifische HLA-Antikörper in niedriger Konzentration enthalten, werden häufig als negativ getestet.

Die Spezifität des LCT wird durch folgende Faktoren herabgesetzt:

- Nicht-HLA-Antikörper führen zu einer unspezifischen Zelllyse, wenn sie mit Nicht-HLA-Antigenen auf der Zelle reagieren. Findet also eine durch Antikörper bedingte Zelllyse statt, ist keine direkte Aussage über das korrespondierende Antigen möglich.
- Während der Isolierung und Verarbeitung der Zellen kommt es häufig zu einer gewissen unspezifischen Zelllyse durch mechanische Überbeanspruchung oder Temperaturschwankungen.
- Immunglobulin-Präparate, die vielen immunsupprimierten Patienten verabfolgt werden, enthalten Antikörper, die im LCT falsch positive Reaktionen auslösen können.

Bei durchflußzytometrischen Ansätzen mit ganzen Zellen als Antigenträgern treten die selben Probleme auf, wie für den LCT beschrieben.

Andere durchflußzytometrische Ansätze sehen die Verwendung von mit Glykoproteinen beschichteten Latexpartikeln (so genannten *beads*) vor. Die Glykoproteine werden dabei aus Zelllysats gewonnen. Das Muster der Beschichtung wird durch Auswahl geeigneter Zellen (56,57) oder über monoklonale Antikörper bestimmt, die bei der Affinitäts-Chromatographie des Zelllysats spezifisch die gewünschten Glykoproteine binden (58). Die beschichteten *beads* werden mit Serum und einem Fluoreszenz-markierten monoklonalen, gegen das Fc $\gamma$ -Fragment humaner Immunglobuline gerichteten Antikörper inkubiert. Im Durchflußzytometer werden die *beads* gezählt und die Intensität an emittierter Fluoreszenz registriert, so dass es möglich ist, die Bindung spezifischer Antikörper qualitativ wie quantitativ festzulegen. Der Untersucher kann dabei über die Auswahl der für die Beschichtung der *beads* verwendeten Glykoproteine den Fokus seiner Suche nach spezifischen Antikörpern bestimmen.

Die Durchflußzytometrie wurde Mitte der 90er Jahre sehr intensiv zur Beforschung von spezifischen HLA-Antikörpern eingesetzt. Wegen der Möglichkeit, die Antigen-Auswahl pro *bead* zu definieren und einzuschränken ist die Durchflußzytometrie spezifischer als der LCT. In weiteren Studien wurde die Überlegenheit in der Sensitivität gegenüber dem LCT nachgewiesen (41,59).

Die Verfahren zur Gewinnung der für die Beschichtung vorgesehenen Antigene können allerdings mit einer Zerstörung von Epitopen einhergehen, so dass die Bindung humaner Allo-Antikörper erschwert bis unmöglich gemacht wird und falsch negative Ergebnisse resultieren. Weiterhin wurden bislang nur Studien mit *beads* durchgeführt, die mit einer größeren Anzahl verschiedener Antigene beschichtet worden waren. Dies führte wie bei der Verwendung ganzer Zellen zu einer Verringerung der Spezifität der Ergebnisse.

In ELISA-Verfahren setzt man ebenfalls Antigene ein, die aus der Zellmembran geeigneter Zellen isoliert und aufgereinigt werden. Diese Moleküle werden über spezifische monoklonale Antikörper an Festphasen gebunden. Nach Zugabe von Serum können Allo-Antikörper durch Inkubation mit spezifischen Enzym-markierten monoklonalen Antikörpern bestimmt werden.

Im MAILA wird die Verbindung zwischen Mikrotiterplatte und Antigen durch zwei monoklonale Antikörper hergestellt: Einen Ziege Anti-Maus Fc $\gamma$ -Antikörper und einen murinen Antikörper, der spezifisch die  $\alpha$ -Kette des HLA-DR Moleküls bindet. Diese Variante wurde eingeführt, um die spezifische Immobilisierung eines definierten Glykoproteins aus einem Antigen-Gemisch zu ermöglichen.

Mit dem MAILA detektiert man im Gegensatz zum LCT auch Antikörper, die kein Komplement aktivieren. Solche Antikörper wurden von FULLER et al. mit Abstoßung bei mehrfach Transplantierten mit HLA-DR *mismatch* in Zusammenhang gebracht (60).

Therapeutisch verabfolgte Immunglobulin-Präparate erzeugen im MAILA keine falsch positiven Ergebnisse, da die Präparate anti-lymphozytäre Antikörper aber keine HLA-Antikörper enthalten.

Der MAILA wurde für die in dieser Arbeit behandelte Fragestellung als optimale Testmethode angesehen, weil er es ermöglicht, Antikörper gegen einzelne molekular definierte Antigene nachzuweisen. Die Besonderheit der Antigen-Immobilisierung erlaubt es, Antikörper gegen schwach exprimierte Antigene aus einem Antigen-Gemisch zu detektieren. Durch die

Auswahl HLA-DR homozygoter B-Zelllinien als Antigenquelle wurde erreicht, dass pro Reaktionsansatz im MAILA ein Serum nur mit genau einer Antigen-Spezifität reagieren konnte.

Der MAILA erwies sich im direkten Vergleich mit dem LCT als sensitiver. Im Titrationsexperiment detektierte der MAILA Antikörper in vier- bis achtfach stärker verdünnten Seren als der LCT.

Bei einer Ko-Präzipitation anderer Zelloberflächenmoleküle mit HLA-DR während des Solubilisierungsschritts konnte man mit falsch positiven Ergebnissen rechnen. Im Absorptionsexperiment wurde allerdings nachgewiesen, dass der MAILA Antikörper nachweist, die spezifisch für HLA-DR sind.

Der MAILA wurde somit als hinreichend sensible und spezifische Testmethode zum Nachweis von HLA-DR Antikörpern bei Patienten nach Nierentransplantation angesehen.

## **6.2 Ergebnisse der klinischen Studie**

### **6.2.1 Prävalenz von HLA-DR Antikörpern**

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Prävalenz von HLA-DR Antikörpern nach Transplantation signifikant höher bei Patienten mit Abstoßung ist im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßung.

Dies stützt die These von AL-HUSSEIN et al., ABE et al., SCHÖNEMANN et al., FAUCHET et al., LEDERER et al. und LORDON et al. (37,61-65), deren Untersuchungen ergaben, dass postoperativ gebildete Antikörper gegen B-Lymphozyten häufiger in Verbindung mit einer geminderten Transplantatfunktion auftreten. SCORNIK et al. bezogen in ihrer Untersuchung (66) diesen Effekt auf spenderspezifische HLA-DR Antikörper.

Nach der Transplantation erstmalig nachweisbare spenderspezifische B-Zell-Antikörper, wurden darüber hinaus von verschiedenen Untersuchern mit chronischer Abstoßung korreliert (38,67,68).

Die Ergebnisse von TING und MORRIS (39), die zeigten, dass weder Funktion noch Überleben eines Transplantats mit der Produktion von B-Zell-Antikörpern korrelierte, werden durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt.

Die von LEWIS et al. (35) geäußerte Vermutung, dass HLA-Klasse II-Antikörper Transplantatempfänger vor Abstoßung schützen, ist damit widerlegt.

### 6.2.2 Prävalenz präformierter HLA-DR Antikörper

Patienten, die sich zum ersten Mal einer Transplantation unterziehen, können durch Schwangerschaft, Bluttransfusion oder Verabfolgung von Plasma oder Gerinnungsfaktorpräparaten vor der Transplantation HLA-Antikörper gebildet haben. Der Einfluss präformierter HLA-Klasse II-Antikörper auf Transplantatüberleben und -funktion ist umstritten.

In dieser Studie wurden präformierte HLA-Klasse II-Antikörper häufiger bei Patienten mit akuter Abstoßung (Gruppe A) als bei Patienten mit komplikationslosem Verlauf (Kontrollgruppe) festgestellt (6 von 20 vs. 4 von 20). Der Unterschied zwischen Gruppe A und der Kontrollgruppe war nicht signifikant.

MARTIN et al., LEDERER et al., GHASEMIAN et al., FAUCHET et al. und LAZDA et al. (34,63,69-71) hatten vor der Transplantation nachweisbare Antikörper gegen B-Lymphozyten oder HLA-Klasse II-Antigene oder HLA-DR Antigene mit einem erhöhten Risiko für akute Abstoßungskrisen und einem verminderten Transplantatüberleben korreliert. Diese Untersuchungsergebnisse konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden.

TAYLOR et al. (36) beschrieben einen Fall, in dem eine Patientin trotz Anwesenheit eines spenderspezifischen HLA-DQ Antikörpers zum Zeitpunkt der Transplantation weder eine hyperakute noch eine akute Abstoßung erlitt. In diesem Fall wurde eine Dreifach-Kombination als immunsuppressive Therapie angesetzt: Ciclosporin, Azathioprin und Prednisolon, wobei Prednisolon in den ersten 5 Tagen post-OP hochdosiert (500 mg i.v. einmal täglich) verabfolgt wurde.



ABE et al. (38) fanden keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen präformierten B-Zell-Antikörpern und der Entwicklung einer chronischen Abstoßung. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Studie nicht thematisiert.

Für das Konzept des günstigen Effekts präformierter B-Zell Antikörper auf Transplantatüberleben und -funktion („*enhancing effect*“), wie es von ETTINGER et al. und LEWIS et al. (35,72) postuliert worden war, wurde in dieser Untersuchung kein Anhalt gefunden.

### 6.2.3 Prävalenz nach der Transplantation nachweisbarer HLA-Klasse II Antikörper

Die Prävalenz von HLA-DR Antikörpern nach Transplantation betrug in dieser Untersuchung bei Patienten mit akuter Abstoßung 50,0% (10 von 20 Patienten; Patient Nr. 16 hatte nur Antikörper im 1. Serum) und bei solchen mit chronischer Abstoßung 69,2%. Der Nachweis von HLA-DR Antikörpern mit dem MAILA hat demnach einen geringen prädiktiven Wert für eine Abstoßung bei ersttransplantierten Leichennierenempfängern. Ausgehend von dieser Studie ist die Diagnose „Abstoßung“ nicht durch den einmaligen Nachweis von HLA-DR Antikörpern begründbar. Ein wiederholter Nachweis von HLA-DR Antikörpern bei ersttransplantierten Leichennierenempfängern kann dagegen neben der Bewertung klinischer Symptome, laborchemischer Daten und radiologischer Befunde zur Diagnosefindung beitragen.

### 6.2.4 Zusammenhang von HLA-DR *mismatch*, Bildung spezifischer Antikörper und Abstoßung

Das Vorliegen eines HLA-DR *mismatch* war signifikant mit einer erhöhten Abstoßungswahrscheinlichkeit korreliert.

Es bestand allerdings kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines HLA-DR *mismatch* und der Bildung von HLA-DR Antikörpern. Unter den Patienten, die ein HLA-DR *mismatch* auf ihrem Nierentransplantat aufwiesen, war kein Unterschied in der Tendenz *mismatch*-spezifische, *mismatch*-unspezifische oder keine HLA-DR Antikörper zu bilden, nachzuweisen.

Bei 5 Patienten konnten Antikörper gegen HLA-DR Allo-Antigene des Spenders gefunden werden, und alle diese Patienten erlitten eine Abstoßung. Der Zusammenhang zwischen der Bildung *mismatch*-spezifischer HLA-DR Antikörper und akuter oder chronischer Abstoßung war statistisch hoch signifikant ( $P \ll 0,001$ ).

Der Befund, dass nur 5 von 15 Patienten (2 von 9 in Gruppe A, 3 von 6 in Gruppe B), die ein HLA-DR *mismatch* aufwiesen und eine akute oder chronische Abstoßung erlitten, *mismatch*-spezifische Antikörper gebildet haben, könnte damit erklärt werden, dass der immunogene Stimulus einer primären Transplantation zunächst zu einer humoralen Immunreaktion gegen ein breites Spektrum von Antigen-Molekülen führt. Erst eine weitere Transplantation führt in der selben Art und Weise wie eine *Booster*-Impfung zu einer Reifung der Affinität von Antikörpern. Diese Hypothese wird von einer Studie von LOBASHEVSKY et al. unterstützt (73). Sie fanden erst nach einer zweiten Transplantation HLA-Klasse II-Antikörper, die spezifisch für inkompatible HLA-DR oder –DQ Moleküle der ersten Spenderniere waren.

Bei den nachgewiesenen „unspezifischen“ HLA-DR Antikörpern könnte es sich auch um Antikörper gegen HLA-Klasse II oder mit HLA-Klasse II-Antigenen assoziierte Antigene handeln, die im Zuge des Entzündungsprozesses einer Abstoßungsreaktion dem Immunsystem präsentiert wurden. Es wäre möglich, dass diese Antikörper mit HLA-DR Molekülen kreuzreagieren, die dem Spender und dem Empfänger gemein sind. Dies würde erklären, warum mehrere Patienten scheinbar gegen autologe HLA-DR Antigene Antikörper produzierten.

#### 6.2.5 Mögliche Ursachen für Transplantatabstoßungsreaktionen in Abwesenheit von HLA-DR Antikörpern

Der Befund, dass einige Patienten aus Gruppe A und B ohne Nachweis von HLA-DR Antikörpern Abstoßungen erlitten, könnte dadurch erklärt werden, dass diese Patienten HLA-Klasse I-Antikörper produziert haben, die zur Abstoßung führten. Auch allospezifische anti-endotheliale Antikörper, die in dieser Untersuchung nicht thematisiert wurden, können bei Nierentransplantatempfängern zu einer Abstoßungskrise führen (74), auch in Abwesenheit von T- und B-Zell reaktiven Antikörpern (75). Akute Abstoßungskrisen sind laut RODRIGUEZ et al. (76) ebenfalls mit IgG gegen endotheliale Antigene, anti-thrombozytären

oder T-Zell-IgM bei gleichzeitiger Abwesenheit spenderspezifischer HLA-Antikörper korreliert. Schließlich wäre es auch möglich, dass die Patienten, bei denen eine akute oder chronische Abstoßung ohne belegbare HLA-Klasse II-Antikörper Bildung nachgewiesen wurde, eine rein zelluläre Abstoßung erlitten.

### 6.3 Ausblick

Es ist in dieser Studie gelungen, den MAILA als Testmethode zum Nachweis von HLA-DR Antikörpern in Seren nierentransplantierter Patienten einzuführen. Der MAILA ist sensitiver und spezifischer als der in der klinischen Routine verwendete LCT. Daher sollte für den Nachweis oder den Ausschluss spezifischer HLA-DR Antikörper bei nierentransplantierten Patienten in Zukunft der LCT durch den MAILA oder ein anderes gleichwertiges glykoproteinspezifisches Testverfahren ersetzt werden.

HLA-DR Antikörper, die in Seren ersttransplantierter Leichennierenempfänger *post transplantationem* nachweisbar waren, sind signifikant mit akuter und chronischer Abstoßung assoziiert. Dadurch kann die von verschiedenen Autoren geäußerte Hypothese, dass HLA-DR Antikörper einen günstigen Effekt auf die Funktion und das Überleben von transplantierten Leichennieren haben, als widerlegt angesehen werden.

Der prädiktive Wert des Nachweises von HLA-DR Antikörpern mit dem MAILA ist jedoch gering, so dass man die klinische Diagnose einer Abstoßung nicht allein auf den Ergebnissen dieses Tests aufbauen kann.

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass postoperativ nachweisbare HLA-DR Antikörper, die spezifisch für ein *mismatch* zwischen Spender und Empfänger auf dem HLA-DR Locus sind, hoch signifikant mit einer Abstoßung korrelieren. Deshalb sollte bei Nachweis spenderspezifischer HLA-DR Antikörper *post transplantationem* mit einer erhöhten Abstoßungstendenz gerechnet werden und die immunsuppressive Therapie entsprechend angepasst werden.

Umfang und Art der Untersuchungen, denen sich ein Patient auf der Warteliste für eine Nierentransplantation unterziehen muss, sind in Deutschland durch *Eurotransplant* geregelt. Die Regelungen sehen zur Zeit vor, dass das Serum solcher Patienten vierteljährlich lediglich auf HLA-Klasse I-Antikörper untersucht wird. Unmittelbar vor der Transplantation wird eine Gewebeverträglichkeitsprobe durchgeführt, das *crossmatch*. Dabei wird im LCT Serum des Empfängers auf Reaktivität gegen Leukozyten des Spenders getestet. Wird keine Reaktivität nachgewiesen, spricht man von einem „negativen *crossmatch*“. Die Richtlinien schreiben lediglich ein positives T-Zell-*crossmatch* als absolute Kontraindikation für die Durchführung einer geplanten Transplantation vor. Der Nachweis von HLA-Klasse II Allo-Antikörpern in der vierteljährlichen *screening*-Untersuchung oder ein positives B-Zell-*crossmatch* stellen keinen Ausschlussgrund für eine Transplantation dar.

Als Begründung für die schwächere Gewichtung des Nachweises von HLA-Klasse II Allo-Antikörpern wird die umstrittene Rolle dieser Antikörper und die mangelhafte Standardisierung der Nachweismethoden angegeben.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass HLA-Klasse II Allo-Antikörper signifikant mit akuter und chronischer Abstoßung korreliert sind und dass mit dem MAILA eine ausreichend sensitive und glykoproteinspezifische Testmethode zum Nachweis von HLA-Klasse II Allo-Antikörpern zur Verfügung steht.

Somit sollten die Richtlinien von *Eurotransplant* den Erkenntnissen dieser Studie angepasst werden, indem der Nachweis von HLA-Klasse II Allo-Antikörpern im MAILA oder einem Verfahren vergleichbarer Sensitivität und Spezifität stärker gewichtet wird. Insbesondere Patienten, die bereits ein Transplantat durch eine humorale Abstoßung verloren haben, sollten vor einer Zweittransplantation mit einem glykoproteinspezifischen Test wie dem MAILA auf das Vorliegen von HLA-Klasse II Antikörpern in regelmäßigen Abständen untersucht werden. Werden HLA-Klasse II Antikörper nachgewiesen, ist zu fordern, dass die Auswahl von Zweit-Transplantaten beschränkt wird. In Frage kommende Organe sollten keine HLA-DR Antigene exprimieren, gegen die spezifische Antikörper nachgewiesen wurden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACD = Acidium-Citrat-Dextrose

Ak = Antikörper

B-LCL = B-lymphoblastoide Zelllinien

BSA = *bovine serum albumine* = Rinderalbumin

CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid

CTS = collaborative transplant study

d = Tag

DMSO = Dimethylsulfoxid

EBAO = Ethidiumbromid-Acridinorange

EBV = Epstein-Barr-Virus

EDTA = Ethylen-di-tetra-amin

ELISA = enzyme linked immuno-sorbent assay

Fc = Fragment cristallizing

FCS = *fetal calf serum* = fötales Kälberserum

g = Gramm oder Konstante für die Erdbeschleunigung (ca. 9,81 m/s<sup>2</sup>)

HLA = humanes Leukozytenantigen

I.E. = Internationale Einheiten

IgG = Immunglobulin G

IgM = Immunglobulin M

l = Liter

LCT = lymphocyte cytotoxicity test

MAILA = monoclonal antibody dependent immobilization of leucocyte antigens assay

MHC = *major histocompatibility complex* = Haupthistokompatibilitätskomplex

OD = *optical density* = Extinktion

OPD = ortho-phenyl-diamin

PBS = phosphate buffered saline

PP = Polypropylen

PRA = *Panel*-reaktive Antikörper

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

TNF-β = Tumor-Nekrose-Faktor-β

TRIS = tris-hydroxymethylaminomethan

UNOS = United Network for Organ Sharing

## 7.2 Tabellen

In den folgenden Tabellen werden die Extinktionswerte aller durchgeführten Tests aufgeführt. Die Ergebnisse sind nach Gruppen und dann nach Patienten und einzelnen Seren geordnet wiedergegeben. Positive Reaktionen mussten in einem zweiten unabhängigen Versuch reproduzierbar sein. Bei Ergebnissen, die positiv gewertet wurden (fett hervorgehoben) ist jeweils das arithmetische Mittel der Extinktionswerte beider Versuche angegeben. In Klammern dahinter erscheint die Schwankungsbreite der Extinktionswerte beider Versuche.

Anm.: <sup>a</sup> Extinktionswerte der untersuchten Seren, <sup>b</sup> Abnahmezeitpunkte der Seren, <sup>c</sup> negativ gewertetes Ergebnis, da in Nachtestung nicht reproduzierbar positiv, k. S. v.: kein Serum verfügbar

### Gruppe A

Patient Nr. 1; Transplantation am 16.04.94,  
Abstoßung am 25.05.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR11, 7

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR11, 7

HLA-DR Antigene	OD <sup>a</sup>		
	18.04.94 <sup>b</sup>	k. S. v.	11.06.94 <sup>b</sup>
DR1	0,043		0,075
DR15(2)	0,170		0,009
DR16(2)	0,043		0,042
DR17(3)	0,015		0,037
DR18(3)	0,187		0,011
DR4	0,074		0,052
DR11(5)	0,077		0,034
DR12(5)	0,023		0,055
DR13(6)	0,082		0,000
DR14(6)	0,039		0,019
DR7	0,177		0,073
DR8	0,051		0,132
DR9	0,185		0,009

Patient Nr. 2; Transplantation am 22.03.95,  
Abstoßung am 27.03.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7, 17

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 17

HLA-DR Antigene	OD		
	23.03.95	31.03.95	k. S. v.
DR1	0,054	0,040	
DR15(2)	0,073	0,036	
DR16(2)	0,013	0,033	
DR17(3)	0,063	0,052	
DR18(3)	0,060	0,020	
DR4	0,054	0,059	
DR11(5)	0,060	0,022	
DR12(5)	0,013	0,005	
DR13(6)	0,024	0,107	
DR14(6)	0,058	0,007	
DR7	0,036	0,005	
DR8	0,054	0,048	
DR9	0,013	0,035	

Patient Nr. 3; Transplantation am 24.06.94,  
Abstoßung am 13.07.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR2, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR15, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	01.07.94	26.07.94	19.09.94
DR1	0,022	0,038	0,003
DR15(2)	0,037	0,027	0,032
DR16(2)	0,002	0,010	0,091
DR17(3)	0,029	0,023	0,003
DR18(3)	0,046	0,018	0,056
DR4	0,012	0,016	0,056
DR11(5)	0,022	0,036	0,028
DR12(5)	0,010	0,010	0,015
DR13(6)	0,072	0,026	0,009
DR14(6)	0,075	0,049	0,016
DR7	0,027	0,015	0,069
DR8	0,015	0,009	0,082
DR9	0,029	0,021	0,005

Patient Nr. 5; Transplantation am 09.02.95,  
Abstoßung am 19.02.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR11,-

HLA-DR Antigene	OD		
	09.02.95	16.02.95	18.03.95
DR1	0,195	0,106	0,016
DR15(2)	0,022	0,020	0,008
DR16(2)	0,018	0,082	0,022
DR17(3)	0,018	0,090	0,081
DR18(3)	0,048	0,049	0,020
DR4	0,013	0,074	0,042
DR11(5)	0,029	0,088	0,040
DR12(5)	0,007	0,044	0,033
DR13(6)	0,033	0,028	0,057
DR14(6)	0,037	0,061	0,001
DR7	0,025	0,027	0,043
DR8	0,008	0,070	0,080
DR9	0,026	0,128	0,015

Patient Nr. 4; Transplantation am 30.08.94,  
Abstoßung am 10.09.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR11, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR11, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	30.08.94	13.09.94	k. S. v.
DR1	0,028	0,007	
DR15(2)	0,004	0,024	
DR16(2)	0,000	0,015	
DR17(3)	0,042	0,015	
DR18(3)	0,042	0,016	
DR4	0,016	0,025	
DR11(5)	0,040	0,013	
DR12(5)	0,003	0,010	
DR13(6)	0,030	0,004	
DR14(6)	0,016	0,041	
DR7	0,032	0,034	
DR8	0,011	0,026	
DR9	0,038	0,039	

Patient Nr. 6; Transplantation am 13.02.95,  
Abstoßung am 24.02.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR11, 15

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR11, 16

HLA-DR Antigene	OD		
	14.02.95	20.02.95	k. S. v.
DR1	0,023	0,081	
DR15(2)	0,029	0,012	
DR16(2)	0,010	0,161	
DR17(3)	0,013	0,210 <sup>c</sup>	
DR18(3)	0,068	0,139	
DR4	0,103	0,359 <sup>c</sup>	
DR11(5)	0,021	0,366 <sup>c</sup>	
DR12(5)	0,011	0,145	
DR13(6)	0,032	0,045	
DR14(6)	0,102	0,251 <sup>c</sup>	
DR7	0,062	0,021	
DR8	0,014	0,317 <sup>c</sup>	
DR9	0,018	0,374 <sup>c</sup>	

Patient Nr. 7; Transplantation am 04.05.94,  
Abstoßung am 02.06.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	04.05.94	01.06.94	k. S. v.
DR1	0,032	0,036	
DR15(2)	0,033	0,073	
DR16(2)	0,057	0,065	
DR17(3)	0,021	0,027	
DR18(3)	0,034	0,052	
DR4	0,029	0,079	
DR11(5)	0,044	0,095	
DR12(5)	0,032	0,085	
DR13(6)	0,006	0,198	
DR14(6)	0,039	0,073	
DR7	0,066	0,138	
DR8	0,026	0,026	
DR9	0,050	0,047	

Patient Nr. 8; Transplantation am 14.10.95,  
Abstoßung am 28.10.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR3,-

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3, 7

HLA-DR Antigene	OD		
	16.10.95	06.11.95	k. S. v.
DR1	0,015	0,088	
DR15(2)	0,018	0,160	
DR16(2)	0,001	0,160	
DR17(3)	0,007	0,067	
DR18(3)	0,003	0,118	
DR4	0,002	0,106	
DR11(5)	0,005	0,057	
DR12(5)	0,007	0,048	
DR13(6)	0,003	0,135	
DR14(6)	0,034	0,091	
DR7	0,030	0,047	
DR8	0,032	0,103	
DR9	0,005	0,118	

Patient Nr. 9; Transplantation am 31.05.95,  
Abstoßung am 15.06.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	31.05.95	26.06.95	30.06.95
DR1	0,006	0,007	0,043
DR15(2)	0,018	0,032	0,014
DR16(2)	0,102	0,049	0,109
DR17(3)	0,023	0,006	0,014
DR18(3)	0,023	0,046	0,001
DR4	0,031	0,057	0,074
DR11(5)	0,042	0,064	0,032
DR12(5)	0,034	0,015	0,039
DR13(6)	0,015	0,016	0,007
DR14(6)	0,015	0,063	0,004
DR7	0,070	0,081	0,002
DR8	0,019	0,039	0,072
DR9	0,035	0,037	0,006

Patient Nr. 10; Transplantation am 28.06.94,  
Abstoßung am 14.07.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR3, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	28.06.94	18.07.94	11.11.94
DR1	0,029	0,022	<b>0,222</b> (± <b>0,013</b> )
DR15(2)	0,020	0,017	0,009
DR16(2)	0,041	0,000	0,008
DR17(3)	0,083	0,073	0,133
DR18(3)	0,062	0,018	0,035
DR4	0,059	0,017	0,021
DR11(5)	0,053	0,136	0,123
DR12(5)	0,223 <sup>c</sup>	0,002	0,170
DR13(6)	0,133	0,105	0,171
DR14(6)	0,083	0,015	0,027
DR7	0,172	0,015	0,167
DR8	0,036	0,007	0,008
DR9	0,066	0,017	0,074



Patient Nr. 11; Transplantation am 08.05.95,  
Abstoßung am 19.05.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	09.05.95	29.05.95	19.06.95
DR1	0,007	0,009	<b>0,463</b> (± 0,064)
DR15(2)	0,035	0,012	0,020
DR16(2)	0,097	0,012	0,202
DR17(3)	0,021	0,024	<b>0,364</b> (± 0,033)
DR18(3)	0,089	0,168	0,084
DR4	0,061	0,079	<b>0,328</b> (± 0,026)
DR11(5)	0,030	0,133	0,024
DR12(5)	0,052	0,005	0,142
DR13(6)	0,069	0,012	0,189
DR14(6)	0,080	0,064	0,031
DR7	0,148	0,003	<b>0,276</b> (± 0,041)
DR8	0,081	0,031	0,072
DR9	0,036	0,062	0,001

Patient Nr. 12; Transplantation am 07.10.95,  
Abstoßung am 31.10.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 15

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 15

HLA-DR Antigene	OD		
	07.10.95	26.10.95	k. S. v.
DR1	0,049	0,054	
DR15(2)	0,024	0,014	
DR16(2)	0,010	0,019	
DR17(3)	0,051	0,044	
DR18(3)	0,033	0,083	
DR4	0,066	<b>0,676</b> (± 0,455)	
DR11(5)	0,063	0,017	
DR12(5)	0,018	0,035	
DR13(6)	<b>0,227</b> (± 0,009)	0,016	
DR14(6)	0,020	<b>0,912</b> (± 0,515)	
DR7	0,098	0,019	
DR8	0,004	0,003	
DR9	0,022	0,031	

Patient Nr. 13; Transplantation am 01.06.95,  
Abstoßung am 21.06.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	02.06.95	23.06.95	01.08.95
DR1	0,008	0,057	0,067
DR15(2)	<b>0,520</b> (± 0,220)	0,117	0,094
DR16(2)	0,039	0,092	0,080
DR17(3)	0,403 <sup>c</sup>	0,048	0,067
DR18(3)	0,086	0,078	0,100
DR4	0,150	0,048	0,154
DR11(5)	0,198	0,101	0,135
DR12(5)	0,170	0,081	0,191
DR13(6)	0,052	0,033	0,199
DR14(6)	0,126	<b>0,259</b> (± 0,029)	0,327 <sup>c</sup>
DR7	0,158	0,115	0,048
DR8	0,176	0,037	0,118
DR9	0,043	0,044	0,101

Patient Nr. 14; Transplantation am 06.06.95,  
Abstoßung am 24.06.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	06.06.95	19.06.95	13.07.95
DR1	0,045	0,147	0,184
DR15(2)	0,041	<b>0,272</b> (± <b>0,018</b> )	0,081
DR16(2)	0,040	0,269 <sup>c</sup>	<b>0,251</b> (± <b>0,037</b> )
DR17(3)	0,083	0,008	0,044
DR18(3)	0,019	0,059	0,057
DR4	0,017	0,040	0,021
DR11(5)	0,014	0,034	0,025
DR12(5)	0,015	0,021	0,091
DR13(6)	0,037	0,000	0,081
DR14(6)	0,124	0,086	0,015
DR7	0,109	0,022	0,026
DR8	0,019	0,048	0,162
DR9	0,035	0,115	0,038

Patient Nr. 15; Transplantation am 22.09.95,  
Abstoßung am 02.10.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR17, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	23.09.95	02.10.95	01.11.95
DR1	<b>0,591</b> (± <b>0,034</b> )	<b>0,573</b> (± <b>0,237</b> )	<b>0,556</b> (± <b>0,100</b> )
DR15(2)	<b>0,404</b> (± <b>0,111</b> )	<b>0,625</b> (± <b>0,086</b> )	<b>0,413</b> (± <b>0,160</b> )
DR16(2)	<b>0,507</b> (± <b>0,273</b> )	<b>0,317</b> (± <b>0,067</b> )	<b>0,453</b> (± <b>0,114</b> )
DR17(3)	0,127	<b>0,585</b> (± <b>0,166</b> )	<b>0,397</b> (± <b>0,096</b> )
DR18(3)	0,146	<b>0,491</b> (± <b>0,185</b> )	<b>0,222</b> (± <b>0,003</b> )
DR4	0,181	<b>0,247</b> (± <b>0,003</b> )	0,180
DR11(5)	0,046	0,089	0,065
DR12(5)	0,084	0,095	0,068
DR13(6)	0,018	0,122	0,143
DR14(6)	0,108	0,221 <sup>c</sup>	0,016
DR7	0,202	<b>0,368</b> (± <b>0,017</b> )	0,146
DR8	0,070	0,032	0,054
DR9	<b>0,597</b> (± <b>0,136</b> )	<b>0,500</b> (± <b>0,115</b> )	0,234 <sup>c</sup>

Patient Nr. 16; Transplantation am 25.12.94,  
Abstoßung am 11.01.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR13,-

HLA-DR Antigene	OD		
	27.12.94	09.01.95	25.01.95
DR1	0,047	0,180	0,117
DR15(2)	0,194	0,157	0,130
DR16(2)	0,128	0,042	0,239 <sup>c</sup>
DR17(3)	<b>0,284</b> (± <b>0,062</b> )	0,197	0,191
DR18(3)	0,168	0,179	0,164
DR4	0,155	0,170	0,156
DR11(5)	0,112	0,100	0,194
DR12(5)	<b>0,559</b> (± <b>0,051</b> )	0,119	0,138
DR13(6)	<b>0,233</b> (± <b>0,024</b> )	0,107	0,192
DR14(6)	0,188	0,143	0,181
DR7	0,106	0,069	0,163
DR8	0,094	0,137	0,066
DR9	0,061	0,123	0,191

Patient Nr. 18; Transplantation am 09.07.94,  
Abstoßung am 14.07.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	11.07.94	21.07.94	01.08.94
DR1	<b>0,284</b> (± <b>0,049</b> )	0,113	0,023
DR15(2)	0,106	0,130	<b>0,536</b> (± <b>0,164</b> )
DR16(2)	0,186	0,076	0,079
DR17(3)	0,191	0,053	0,229 <sup>c</sup>
DR18(3)	0,094	0,149	0,245 <sup>c</sup>
DR4	0,039	0,224 <sup>c</sup>	0,037
DR11(5)	0,021	0,158	0,074
DR12(5)	0,163	0,095	0,021
DR13(6)	0,147	0,142	0,087
DR14(6)	0,079	0,181	0,056
DR7	0,030	0,029	0,086
DR8	0,082	0,009	0,000
DR9	0,011	0,141	0,102

Patient Nr. 17; Transplantation am 08.03.95,  
Abstoßung am 15.03.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR6, 11

HLA-DR Antigene	OD		
	08.03.95	16.03.95	30.03.95
DR1	0,000	0,009	0,040
DR15(2)	0,026	0,005	0,049
DR16(2)	0,023	0,145	0,023
DR17(3)	0,037	0,013	0,045
DR18(3)	0,103	0,164	0,012
DR4	0,080	0,126	0,040
DR11(5)	0,075	0,203	0,054
DR12(5)	0,046	0,079	0,021
DR13(6)	0,031	0,005	0,076
DR14(6)	0,041	0,204	0,010
DR7	0,053	0,013	0,076
DR8	0,029	<b>0,351</b> (± <b>0,069</b> )	0,086
DR9	0,136	0,121	0,009

Patient Nr. 19; Transplantation am 09.02.95,  
Abstoßung am 19.02.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1, 13

HLA-DR Antigene	OD		
	13.02.95	22.02.95	30.03.95
DR1	0,077	0,181	0,047
DR15(2)	0,152	0,146	0,106
DR16(2)	0,184	0,189	0,167
DR17(3)	0,138	0,080	0,145
DR18(3)	0,122	<b>0,266</b> (± <b>0,008</b> )	0,134
DR4	0,190	0,114	0,092
DR11(5)	0,080	0,085	0,113
DR12(5)	0,133	0,123	<b>0,237</b> (± <b>0,017</b> )
DR13(6)	0,195	0,146	0,099
DR14(6)	0,190	0,179	0,104
DR7	0,181	0,175	<b>0,363</b> (± <b>0,102</b> )
DR8	0,128	0,131	0,158
DR9	0,093	0,145	<b>0,576</b> (± <b>0,044</b> )

Patient Nr. 20; Transplantation am 21.05.95,  
Abstoßung am 07.06.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR16, 7

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR15, 17

HLA-DR Antigene	OD		
	22.05.94	31.05.94	23.06.94
DR1	0,032	0,326 <sup>c</sup>	0,217 <sup>c</sup>
DR15(2)	0,066	0,394 <sup>c</sup>	<b>0,331</b> (± <b>0,110</b> )
DR16(2)	<b>0,545</b> (± <b>0,002</b> )	0,214 <sup>c</sup>	0,122
DR17(3)	0,160	0,216 <sup>c</sup>	0,314 <sup>c</sup>
DR18(3)	0,233 <sup>c</sup>	0,123	0,305 <sup>c</sup>
DR4	<b>0,353</b> (± <b>0,139</b> )	0,261 <sup>c</sup>	0,171
DR11(5)	<b>0,441</b> (± <b>0,210</b> )	0,242 <sup>c</sup>	0,109
DR12(5)	0,138	<b>0,312</b> (± <b>0,069</b> )	0,115
DR13(6)	0,264 <sup>c</sup>	0,292 <sup>c</sup>	<b>0,500</b> (± <b>0,277</b> )
DR14(6)	<b>0,451</b> (± <b>0,122</b> )	<b>0,546</b> (± <b>0,076</b> )	0,175
DR7	0,187	0,175	0,179
DR8	0,320 <sup>c</sup>	0,178	0,405 <sup>c</sup>

## Kontrollgruppe

Patient Nr. 21; Transplantation am 05.05.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR3, 8

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 8

HLA-DR Anti-gene	OD	
	05.05.94	k. S. v.
DR1	0,133	
DR15(2)	0,016	
DR16(2)	0,036	
DR17(3)	0,012	
DR18(3)	0,066	
DR4	0,037	
DR11(5)	0,026	
DR12(5)	0,023	
DR13(6)	0,013	
DR14(6)	0,029	
DR7	0,034	
DR8	0,024	
DR9	0,031	

Patient Nr. 23; Transplantation am 21.07.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR3, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 4

HLA-DR Anti-gene	OD	
	21.07.94	24.10.94
DR1	0,023	0,029
DR15(2)	0,064	0,032
DR16(2)	0,038	0,007
DR17(3)	0,011	0,045
DR18(3)	0,108	0,035
DR4	0,033	0,023
DR11(5)	0,063	0,017
DR12(5)	0,030	0,038
DR13(6)	0,002	0,099
DR14(6)	0,036	0,017
DR7	0,159	0,169
DR8	0,044	0,075
DR9	0,028	0,040

Patient Nr. 22; Transplantation am 19.07.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers: DR7, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 11

HLA-DR Anti-gene	OD	
	19.07.94	13.08.94
DR1	0,140	0,020
DR15(2)	0,035	0,045
DR16(2)	0,015	0,024
DR17(3)	0,060	0,040
DR18(3)	0,052	0,036
DR4	0,008	0,047
DR11(5)	0,058	0,008
DR12(5)	0,031	0,041
DR13(6)	0,003	0,059
DR14(6)	0,013	0,007
DR7	0,031	0,078
DR8	0,008	0,138
DR9	0,021	0,077

Patient Nr. 24; Transplantation am 30.07.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR3,-

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3,-

HLA-DR Anti-gene	OD	
	30.07.94	20.10.94
DR1	0,005	0,001
DR15(2)	0,066	0,007
DR16(2)	0,084	0,002
DR17(3)	0,019	0,018
DR18(3)	0,124	0,023
DR4	0,080	0,016
DR11(5)	0,020	0,013
DR12(5)	0,012	0,002
DR13(6)	0,014	0,122
DR14(6)	0,030	0,033
DR7	0,029	0,037
DR8	0,003	0,168
DR9	0,010	0,052

Patient Nr. 25; Transplantation am 17.08.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4,-

HLA-DR Anti-gene	OD	
	17.08.94	11.10.94
DR1	0,031	0,018
DR15(2)	0,065	0,032
DR16(2)	0,009	0,016
DR17(3)	0,016	0,008
DR18(3)	0,011	0,027
DR4	0,066	0,037
DR11(5)	0,032	0,046
DR12(5)	0,085	0,030
DR13(6)	0,053	0,009
DR14(6)	0,042	0,020
DR7	0,049	0,046
DR8	0,052	0,032
DR9	0,012	0,073

Patient Nr. 27; Transplantation am 16.09.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR3, 7

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3, 7

HLA-DR Anti-gene	OD	
	16.09.94	29.12.94
DR1	0,047	0,018
DR15(2)	0,023	0,012
DR16(2)	0,005	0,004
DR17(3)	0,021	0,002
DR18(3)	0,134	0,017
DR4	0,034	0,016
DR11(5)	0,055	0,155
DR12(5)	0,100	0,100
DR13(6)	0,002	0,028
DR14(6)	0,114	0,021
DR7	0,030	0,151
DR8	0,009	0,060
DR9	0,035	0,066

Patient Nr. 26; Transplantation am 27.08.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR15, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR15, 11

HLA-DR Anti-gene	OD	
	27.08.94	17.10.94
DR1	0,030	0,167
DR15(2)	0,041	0,099
DR16(2)	0,011	0,051
DR17(3)	0,021	0,002
DR18(3)	0,090	0,047
DR4	0,061	0,018
DR11(5)	0,022	0,030
DR12(5)	0,081	0,028
DR13(6)	0,130	0,063
DR14(6)	0,038	0,035
DR7	0,017	0,082
DR8	0,063	0,078
DR9	0,010	0,003

Patient Nr. 28; Transplantation am 25.09.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7, 17

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 17

HLA-DR Anti-gene	OD	
	25.09.94	07.11.94
DR1	0,038	0,020
DR15(2)	0,060	0,072
DR16(2)	0,027	0,002
DR17(3)	0,006	0,004
DR18(3)	0,063	0,128
DR4	0,057	0,008
DR11(5)	0,028	0,027
DR12(5)	0,026	0,074
DR13(6)	0,022	0,072
DR14(6)	0,079	0,075
DR7	0,099	0,040
DR8	0,109	0,026
DR9	0,006	0,140

Patient Nr. 29; Transplantation am 17.10.94

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 15

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1,-

HLA-DR Anti-gene	OD	
	17.10.94	09.01.95
DR1	0,047	0,029
DR15(2)	0,087	0,007
DR16(2)	0,052	0,016
DR17(3)	0,030	0,006
DR18(3)	0,054	0,045
DR4	0,046	0,018
DR11(5)	0,017	0,030
DR12(5)	0,044	0,207
DR13(6)	0,106	0,060
DR14(6)	0,034	0,082
DR7	0,130	0,053
DR8	0,117	0,031
DR9	0,017	0,043

Patient Nr. 31; Transplantation am 02.03.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR8, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR8, 13

HLA-DR Anti-gene	OD	
	03.03.95	23.03.95
DR1	0,087	0,023
DR15(2)	0,083	0,066
DR16(2)	0,066	0,038
DR17(3)	0,037	0,041
DR18(3)	0,202	0,038
DR4	0,089	0,009
DR11(5)	0,063	0,060
DR12(5)	0,069	0,082
DR13(6)	0,003	0,048
DR14(6)	0,022	0,015
DR7	0,077	0,142
DR8	0,105	0,038
DR9	0,111	0,002

Patient Nr. 30; Transplantation am 21.02.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7, 15

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 15

HLA-DR Anti-gene	OD	
	25.02.95	23.05.95
DR1	0,040	0,010
DR15(2)	0,066	0,111
DR16(2)	0,020	0,013
DR17(3)	0,049	0,006
DR18(3)	0,041	0,022
DR4	0,012	0,019
DR11(5)	0,009	0,093
DR12(5)	0,031	0,029
DR13(6)	0,104	0,080
DR14(6)	0,005	0,045
DR7	0,071	0,103
DR8	0,036	0,015
DR9	0,062	0,183

Patient Nr. 32; Transplantation am 26.04.95

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 17

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3, 4

HLA-DR Anti-gene	OD	
	26.04.95	29.05.95
DR1	0,182	0,033
DR15(2)	0,099	0,098
DR16(2)	0,032	0,024
DR17(3)	0,009	0,031
DR18(3)	0,083	0,010
DR4	0,015	0,010
DR11(5)	0,017	0,040
DR12(5)	0,054	0,032
DR13(6)	0,055	0,035
DR14(6)	0,071	0,010
DR7	0,166	0,080
DR8	0,183	0,009
DR9	0,059	0,122

Patient Nr. 33; Transplantation am 19.06.95  
 HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
 DR13,-  
 HLA-DR Merkmale des Spenders: DR13,-

HLA-DR Anti-gene	OD	
	20.06.95	07.07.95
DR1	0,053	0,050
DR15(2)	0,077	0,003
DR16(2)	0,045	0,017
DR17(3)	0,035	0,016
DR18(3)	0,125	0,008
DR4	0,056	0,000
DR11(5)	0,066	0,005
DR12(5)	0,072	0,012
DR13(6)	0,096	0,008
DR14(6)	0,057	0,030
DR7	0,080	0,030
DR8	0,126	0,008
DR9	0,131	0,022

Patient Nr. 35; Transplantation am 25.03.95  
 HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
 DR3, 14  
 HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 17

HLA-DR Anti-gene	OD	
	27.03.95	03.05.95
DR1	0,014	0,020
DR15(2)	0,074	0,079
DR16(2)	0,017	0,005
DR17(3)	0,012	0,061
DR18(3)	0,130	0,015
DR4	0,011	0,006
DR11(5)	0,008	0,024
DR12(5)	0,008	0,051
DR13(6)	0,008	0,031
DR14(6)	0,010	0,018
DR7	0,022	0,030
DR8	0,033	0,011
DR9	0,015	0,046

Patient Nr. 34; Transplantation am 25.02.95  
 HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
 DR7, 15  
 HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 18

HLA-DR Anti-gene	OD	
	25.02.95	16.03.95
DR1	0,030	0,040
DR15(2)	0,048	0,055
DR16(2)	0,020	0,003
DR17(3)	0,088	0,025
DR18(3)	0,140	0,038
DR4	0,029	0,000
DR11(5)	0,035	0,053
DR12(5)	0,039	0,089
DR13(6)	0,038	0,097
DR14(6)	0,012	0,043
DR7	0,119	0,050
DR8	0,063	0,030
DR9	0,088	0,117

Patient Nr. 36; Transplantation am 31.07.94  
 HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
 DR3, 7  
 HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 7

HLA-DR Anti-gene	OD	
	01.08.94	05.10.94
DR1	0, 119	<b>0,468 (± 0,019)</b>
DR15(2)	0,195	0,051
DR16(2)	0,012	0,018
DR17(3)	0,074	0,000
DR18(3)	0,021	0,053
DR4	0,031	0,085
DR11(5)	0,091	0,055
DR12(5)	0,157	0,104
DR13(6)	0,001	0,084
DR14(6)	0,023	0,045
DR7	0,089	0,092
DR8	0,123	0,131
DR9	0,068	0,054



Patient Nr. 37; Transplantation am 09.12.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR11, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR11, 13

HLA-DR Anti-gene	OD	
	08.12.94	06.01.95
DR1	0,018	0,038
DR15(2)	0,151	0,054
DR16(2)	0,027	0,035
DR17(3)	0,012	0,003
DR18(3)	0,043	0,031
DR4	0,253 <sup>c</sup>	0,045
DR11(5)	0,019	0,043
DR12(5)	<b>0,235 (± 0,012)</b>	0,040
DR13(6)	0,005	0,115
DR14(6)	0,033	0,044
DR7	0,169	0,066
DR8	0,066	0,052
DR9	0,009	0,188

Patient Nr. 39; Transplantation am 13.09.95  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR15, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR15, 13

HLA-DR Anti-gene	OD	
	14.09.95	05.10.95
DR1	<b>0,334 (± 0,001)</b>	0,049
DR15(2)	0,088	0,076
DR16(2)	0,099	0,052
DR17(3)	0,116	0,005
DR18(3)	0,175	0,071
DR4	0,161	0,019
DR11(5)	0,165	0,075
DR12(5)	0,210 <sup>c</sup>	0,107
DR13(6)	0,080	0,075
DR14(6)	0,137	0,058
DR7	0,207	0,078
DR8	0,181	0,064
DR9	0,100	0,064

Patient Nr. 38; Transplantation am 20.09.94  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR17, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 11

HLA-DR Anti-gene	OD	
	19.09.94	24.10.94
DR1	0,057	0,038
DR15(2)	0,124	0,097
DR16(2)	0,065	0,043
DR17(3)	0,060	0,000
DR18(3)	0,145	0,059
DR4	0,027	0,081
DR11(5)	0,168	0,076
DR12(5)	<b>0,572 (± 0,098)</b>	0,040
DR13(6)	0,160	0,018
DR14(6)	<b>0,238 (± 0,015)</b>	0,055
DR7	0,074	0,105
DR8	0,148	0,051
DR9	0,412 <sup>c</sup>	0,003

Patient Nr. 40; Transplantation am 23.01.95  
HLA-DR Merkmale des Empfängers:  
DR17,-

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1, 17

HLA-DR Anti-gene	OD	
	19.01.95	11.02.95
DR1	0,014	0,038
DR15(2)	0,113	0,029
DR16(2)	0,105	-0,006
DR17(3)	0,095	0,001
DR18(3)	0,089	0,007
DR4	0,064	0,005
DR11(5)	0,047	0,004
DR12(5)	0,068	0,042
DR13(6)	0,135	0,038
DR14(6)	0,016	0,041
DR7	0,066	0,090
DR8	<b>0,245 (± 0,007)</b>	0,005
DR9	0,010	0,219 <sup>c</sup>

Gruppe B

Patient Nr. 41; Transplantation am 26.01.98,  
Abstoßung am 11.03.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR2, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR2, 4

HLA-DR Anti-gene	OD
	11.03.99
DR1	0,009
DR15(2)	0,087
DR16(2)	0,024
DR17(3)	0,065
DR18(3)	0,135
DR4	0,047
DR11(5)	0,049
DR12(5)	0,047
DR13(6)	0,030
DR14(6)	0,062
DR7	0,010
DR8	0,046
DR9	0,022

Patient Nr. 43; Transplantation am 02.02.99,  
Abstoßung am 08.12.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR3, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3, 4

HLA-DR Anti-gene	OD
	08.12.99
DR1	0,001
DR15(2)	0,090
DR16(2)	0,022
DR17(3)	0,085
DR18(3)	0,053
DR4	0,033
DR11(5)	0,056
DR12(5)	0,013
DR13(6)	0,027
DR14(6)	0,000
DR7	0,007
DR8	0,050
DR9	0,032

Patient Nr. 42; Transplantation am 10.01.98,  
Abstoßung am 25.11.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 7

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1,-

HLA-DR Anti-gene	OD
	25.11.99
DR1	0,003
DR15(2)	0,030
DR16(2)	0,036
DR17(3)	0,086
DR18(3)	0,083
DR4	0,080
DR11(5)	0,079
DR12(5)	0,038
DR13(6)	0,051
DR14(6)	0,067
DR7	0,025
DR8	0,133
DR9	0,030

Patient Nr. 44; Transplantation am 17.08.91,  
Abstoßung am 01.06.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 13

HLA-DR Anti-gene	OD
	23.04.99
DR1	0,002
DR15(2)	0,007
DR16(2)	0,013
DR17(3)	0,088
DR18(3)	0,142
DR4	0,068
DR11(5)	0,052
DR12(5)	0,023
DR13(6)	0,036
DR14(6)	0,015
DR7	0,041
DR8	0,070
DR9	0,038

Patient Nr. 45; Transplantation am 10.02.98,  
Abstoßung am 08.12.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 13

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 13

HLA-DR Anti-gene	OD
	08.12.99
DR1	0,000
DR15(2)	0,080
DR16(2)	0,140
DR17(3)	0,176
DR18(3)	0,080
DR4	0,029
DR11(5)	0,076
DR12(5)	<b>0,304 (± 0, 058)</b>
DR13(6)	0,049
DR14(6)	0,009
DR7	0,185
DR8	0,080
DR9	0,045

Patient Nr. 46; Transplantation am 11.02.92,  
Abstoßung am 31.03.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR1, 4

HLA-DR Anti-gene	OD
	31.03.99
DR1	0,087
DR15(2)	<b>0,234 (± 0,009)</b>
DR16(2)	0,159
DR17(3)	<b>0,289 (± 0,005)</b>
DR18(3)	0,143
DR4	0,155
DR11(5)	0,204
DR12(5)	<b>0,307 (± 0,092)</b>
DR13(6)	<b>0,306 (± 0,038)</b>
DR14(6)	0,051
DR7	0,131
DR8	0,138
DR9	<b>0,240 (± 0,021)</b>

Patient Nr. 16; Transplantation am 25.12.94,  
Abstoßung am 26.07.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR13

HLA-DR Anti-gene	OD
	26.07.99
DR1	0,004
DR15(2)	0,008
DR16(2)	0,005
DR17(3)	0,039
DR18(3)	0,020
DR4	0,029
DR11(5)	0,032
DR12(5)	0,028
DR13(6)	0,014
DR14(6)	0,017
DR7	<b>0,409 (± 0,135)</b>
DR8	0,008
DR9	0,020

Patient Nr. 47; Transplantation am 08.05.92,  
Abstoßung am 06.07.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR17, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3, 4

HLA-DR Anti-gene	OD
	06.07.99
DR1	0,085
DR15(2)	<b>0,238 (± 0,011)</b>
DR16(2)	<b>0,378 (± 0,101)</b>
DR17(3)	<b>0,466 (± 0,026)</b>
DR18(3)	<b>0,672 (± 0,179)</b>
DR4	<b>0,593 (± 0,015)</b>
DR11(5)	<b>0,516 (± 0,030)</b>
DR12(5)	<b>0,423 (± 0,210)</b>
DR13(6)	<b>0,367 (± 0,097)</b>
DR14(6)	<b>0,620 (± 0,135)</b>
DR7	<b>0,512 (± 0,088)</b>
DR8	<b>0,318 (± 0,029)</b>
DR9	<b>0,466 (± 0,072)</b>

Patient Nr. 24; Transplantation am 29.07.94,  
Abstoßung am 16.07.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR3,-

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR3,-

HLA-DR Anti-gene	OD
	16.07.99
DR1	0,025
DR15(2)	0,037
DR16(2)	0,177
DR17(3)	<b>0,339 (± 0,031)</b>
DR18(3)	<b>0,270 (± 0,014)</b>
DR4	0,192
DR11(5)	0,065
DR12(5)	0,029
DR13(6)	<b>0,374 (± 0,018)</b>
DR14(6)	0,107
DR7	0,171
DR8	0,050
DR9	0,034

Patient Nr. 49; Transplantation am: 18.10.96,  
Abstoßung am 17.12.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR4, 11

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR4, 12

HLA-DR Anti-gene	OD
	17.12.99
DR1	0,000
DR15(2)	0,045
DR16(2)	0,083
DR17(3)	0,139
DR18(3)	0,107
DR4	0,076
DR11(5)	0,113
DR12(5)	<b>0,379 (± 0,015)</b>
DR13(6)	<b>0,464 (± 0,219)</b>
DR14(6)	0,000
DR7	0,011
DR8	<b>0,393 (± 0,078)</b>
DR9	0,046

Patient Nr. 48 Transplantation: 03.12.98,  
Abstoßung am 29.09.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 14

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR17, 11

HLA-DR Anti-gene	OD
	29.09.99
DR1	0,012
DR15(2)	0,075
DR16(2)	0,097
DR17(3)	0,132
DR18(3)	0,119
DR4	<b>0,278 (± 0,033)</b>
DR11(5)	<b>0,308 (± 0,081)</b>
DR12(5)	0,064
DR13(6)	0,077
DR14(6)	<b>0,257 (± 0,003)</b>
DR7	0,091
DR8	0,092
DR9	0,064

Patient Nr. 50; Transplantation am 04.01.97,  
Abstoßung am 03.03.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR1, 4

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR5, 7

HLA-DR Anti-gene	OD
	03.03.99
DR1	0,018
DR15(2)	0,138
DR16(2)	<b>0,218 (± 0,008)</b>
DR17(3)	<b>0,344 (± 0,051)</b>
DR18(3)	<b>0,613 (± 0,121)</b>
DR4	0,108
DR11(5)	0,204
DR12(5)	0,073
DR13(6)	0,121
DR14(6)	0,164
DR7	0,183
DR8	<b>0,214 (± 0,001)</b>
DR9	<b>0,262 (± 0,035)</b>

Patient Nr. 51; Transplantation am 05.07.95,  
Abstoßung am 01.09.99

HLA-DR Merkmale des Empfängers:

DR7,-

HLA-DR Merkmale des Spenders: DR7, 17

HLA-DR Anti-gene	OD
	04.04.99
DR1	<b>0,255 (± 0,006)</b>
DR15(2)	0,130
DR16(2)	<b>0,439 (± 0,023)</b>
DR17(3)	<b>0,376 (± 0,108)</b>
DR18(3)	<b>0,630 (± 0,142)</b>
DR4	<b>0,877 (± 0,351)</b>
DR11(5)	<b>0,334 (± 0,121)</b>
DR12(5)	<b>0,694 (± 0,085)</b>
DR13(6)	0,199
DR14(6)	<b>0,434 (± 0,132)</b>
DR7	<b>0,511 (± 0,119)</b>
DR8	<b>0,843 (± 0,451)</b>
DR9	<b>0,230 (± 0,016)</b>

### 7.3 Literaturverzeichnis

1. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins 1955. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 201-204.
2. Padberg W, Schwemmle K. Transplantationschirurgie. In: Koslowski L, Bushe KA, Junginger T, Schwemmle K. eds. *Die Chirurgie*. Stuttgart, New York: Schattauer, 1999: 213-229.
3. Largiadèr F, Binswanger U. *Checkliste Organtransplantation*. Stuttgart, New York: Thieme, 1996.
4. Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney - pathophysiology, diagnosis and prevention. *Annals of Transplantation* 1996;1: 5-9.
5. Denton MD, Singh AK. Recurrent and De Novo Glomerulonephritis in the Renal Allograft. *Seminars in Nephrology* 2000;20: 164-175.
6. Brown ED, Chen MYM, Wolfman NT, Ott DJ, Watson NE Jr. Complications of Renal Transplantation: Evaluation with US and Radionuclide Imaging. *RadioGraphics* 2000;20: 607-622.
7. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *New England Journal of Medicine* 1994;331: 365-376.
8. Rigg KM. Renal transplantation: Current status, complications and prevention. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1995;36: 51-57.
9. Beyga ZT, Kahan BD. Surgical complications of kidney transplantation. *Journal of Nephrology* 1998;11: 137-145.
10. Spinosa DJ, Isaacs RB, Matsumoto AH, Angle JF, Hagspiel KD, Leung DA. Angiographic evaluation and treatment of transplant renal artery stenosis. *Curr Opin Urol* 2001;11: 197-205.
11. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH. Urinary tract infection in the immunocompromised host - Lessons from kidney transplantation and the AIDS epidemic. *Infectious Disease Clinics of North America* 11[3], 707-717. 1997.
12. Köhler H. Nephrologie. In: Alexander K, Daniel WG. eds. *Thiemes Innere Medizin*. Stuttgart, New York: Thieme, 1999: 1289-1456.

13. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine* 1969;280: 735-739.
14. Bohle A. Niere und harnableitende Organe. In: Eder M, Gedigk P. eds. *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1990: 699-732.
15. Boom H, Mallat MJK, De Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney International* 2000;58: 859-866.
16. Woo YM, Jardine AG, Clark AF et al. Early graft function and patient survival following cadaveric renal transplantation. *Kidney International* 1999;55: 692-699.
17. Matas AJ, Burke JF Jr, de Vault GA Jr, Monaco A, Pirsch JD. Chronic Rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994;4 (8 Suppl): 23-29.
18. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International* 1999;55: 713-723.
19. Wilhelm MJ, Kusaka M, Pratschke J, Tilney NL. Chronic Rejection: Increasing Evidence for the Importance of Allogene-Independent Factors. *Transplant Proc* 1998;30: 2402-2406.
20. Almond PS, Matas AJ, Gillingham KJ et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993;55: 752-757.
21. Cecka JM. Early rejection: Determining the fate of renal transplants. *Transplant Proc* 1991;23: 1263-1264.
22. Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtekin U, Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes of graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation* 1992;53: 323-328.
23. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ et al. Early vs. late acute renal allograft rejection: Impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993;55: 993-995.
24. Tesi RJ, Henry ML, Elkhannas EA, Ferguson RM. Predictors of long-term primary cadaveric renal transplant survival. *Clin Transplant* 1993;7: 345-352.
25. Waßmuth R. Einführung in das HLA-System. Landsberg: ecomed, 1995.

26. Zinkernagel RM. Grundlagen der Immunologie. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, eds. Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart, New York: Thieme, 1998: 43-136.
27. Arnheim K. HERDER Lexikon der Biochemie & Molekularbiologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
28. Abbas AK, Lichtman AH. Immune responses against tumors and transplants: Immunity to noninfectious transformed and foreign cells. In: Abbas AK, Lichtman AH, eds. Basic Immunology - Functions and disorders of the immune system. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2001: 183-199.
29. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. The New England Journal of Medicine 1998;338: 1813-1821.
30. Feucht HE, Opelz G. The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. Kidney International 1996;50: 1464-1475.
31. Thorogood J, van Houwelingen JC, van Rood JJ, Persijn GG. The impact of center variation on the HLA-DR matching effect in kidney graft survival. Transplantation 1989;48: 231-238.
32. Pirsch JD, D'Alessandro AM, Sollinger HW et al. The effect of donor age, recipient age, and HLA match on immunologic graft survival in cadacer renal transplant recipients. Transplantation 1992;53: 55-59.
33. Diethelm AG, Blackstone EH, Naftel DC et al. Important risk factors of allograft survival in cadaveric renal transplantation - A study of 426 patients. Annals of Surgery 1988;207: 538-548.
34. Ghasemian SR, Light JA, Sasaki TA, Barhyte DY. Hyperacute rejection from antibody against class II HLA antigens. Clinical Transplantation 1998;12: 569-571.
35. Lewis RE, Brackin MN, Cruse JM et al. Anti-Class II antibody production prolongs renal allograft survival. Pathology and Immunopathology Research 1989;8: 287-299.
36. Taylor CJ, Chapman JR, Fuggle SV, Ting A, Morris PJ. A positive B cell crossmatch due to IgG anti-HLA DQ antibody present at the time of



- transplantation in a successful renal allograft. *Tissue Antigens* 1987;30: 104-112.
37. Abe M, Sannomiya A, Koike T et al. Postoperative production of anti-donor antibody and early graft loss due to vascular rejection in renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 1998;30: 2963.
38. Abe M, Kawai T, Futatsuyama K et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997;63: 1616-1619.
39. Ting A, Morris PJ. Development of donor-specific B lymphocyte antibodies after renal transplantation - No correlation with graft outcome. *Transplantation* 1979;28: 13-17.
40. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* 1964;204: 998-1000.
41. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M et al. Flow Cytometry analysis: A high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplantation Proceedings* 1983;15: 1939-1944.
42. van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 15[3], 232-236. 1971.
43. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA): A New Tool for the Identification of Platelet-Reactive Antibodies. *Blood* 1987;70: 1722-1726.
44. Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Schmidt A, Tlusty A, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Discrimination of antibodies against antigens of different MHC loci in human Serum by monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens. *Human Immunology* 1989;25: 125-134.
45. Lattermann A. Untersuchungen zum serologischen Nachweis von HLA-DP Antigenen. 1-173. 1991. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
46. Siegler A. Serologische Typisierung von HLA-DP-Antigenen im MAILA (monoclonal antibody-specific immobilization on leucocyte antigens) im Vergleich zu ihrer molekularbiologischen Definition aus genomischer DNA. 1-154. 1996. Justus-Liebig-Universität, Gießen.

47. Nilsson R, van't Klooster, van der Poel JY, Davis WC, Schreuder GM. Complexity of the bovine MHC class-II specificity DW3 as defined by alloantiSeren. *Eur J Immunogenet* 1994;21: 169-180.
48. Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Schmidt A, Tlusty A, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Incidence and specificity of HLA-DP antibodies in pregnancy Seren. *Hum. Immunol.* 29, 166-174. 1990.
49. Sanchez B, Melero J, Garcia-Lozano JR. et al. Application of the MAILA technique to the study of human anti-HLA monoclonal antibody specificity. *J Immunol Methods* 1993;157: 253-258.
50. ten Hoor GM, Coopmans M, Allebes WA. Specificity and Ig class of preformed alloantibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. The implications for graft survival. *Transplantation* 1993;56: 298-304.
51. Pfeiffer K, Vogeler U, Albrecht KH, Eigler FW, Buchholz B, Grosse-Wilde H. HLA-DP antibodies in patients awaiting renal transplantation. *Transplantation International* 1995;8: 180-184.
52. Hofmann GO, Falk C, Wangemann T. Immunological transformations in the recipient of grafted allogeneic human bone. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116: 143-150.
53. Santoso S, Kiefel V. Human platelet alloantigens. *Wiener Klinische Wochenschrift* 113[20-21], 806-813. 2001.
54. Fricke L, Klüter H, Feddersen A et al. Preoperative application of glucocorticosteroids efficaciously reduces the primary immunoligical response in kidney transplantation. *Clinical Transplantation* 1996;10: 432-436.
55. Kimura A, Dong H, Harada H, Sasazuki T. DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* 1992;40: 5-12.
56. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 1999;60: 1293-1302.
57. Sumitran-Karuppan S, Möller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determination of donor-reactive antibodies. *Transplantation* 1996;61: 1539-1545.

58. Sumitran-Karuppan S, Möller E. Specific inhibition of HLA class I and II antibodies by soluble antigens - A method for the identification of antibody specificity in Seren from alloimmunized individuals. *Transplantation* 1994;58: 713-719.
59. Sutton PM, Harmer AW, Bayne AM, Welsh KI. The flow cytometric detection of alloantibodies in screening for renal transplantation. *Transplantation International* 8, 360. 1995.
60. Fuller A, Profaizer T, Roberts L, Fuller TC. Repeat donor HLA-DR *mismatches* in renal transplantation: Is the increased failure rate caused by noncytotoxic HLA-DR antibodies. *Transplantation* 1999;68: 589-591.
61. Al-Hussein KA, Shenton BK, Bell A et al. Characterization of donor-directed antibody class in the post-transplant period using flow cytometry in renal transplantation. *Transplantation International* 1994;7: 182-189.
62. Schönemann C, Groth J, Leverenz S, May G. HLA class I and class II antibodies - Monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 1998;65: 1519-1523.
63. Fauchet R, Genetet B, Campion JP et al. Occurrence and specificity of anti-B lymphocyte antibodies in renal allograft recipients. *Transplantation* 1980;30: 114-117.
64. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney International* 2001;59: 334-341.
65. Lordon RE, Stelzer GT, Ferrone S. The early posttransplant prognosis of acute renal allograft rejection as determined by detection of cytotoxic antibodies to lymphoid B cell lines. *Transplantation* 1984;38: 493-497.
66. Scornik JC, LeFor WM, Cicciarelli JC et al. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992;54: 61-64.
67. Kerman RH, Susskind B, Kerman DH et al. Anti-HLA Antibodies detected in posttransplant renal allograft recipient Seren correlate with chronic rejection. *Transplantation Proceedings* 1997;29: 1515-1516.
68. Piazza A, Poggi E, Borrelli L et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation:

- posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001;71: 1106-1112.
69. Martin S, Dyer PA, Mallick NP, Gokal R, Harris R, Johnson RWG. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation* 1987;44: 50-53.
70. Lederer SR, Schneeberger H, Albert E et al. Early renal graft dysfunction - The role of preformed antibodies to DR-typed lymphoblastoid cell lines. *Transplantation* 1996;61: 313-319.
71. Lazda V. Identification of patients at risk for inferior renal allograft outcome by a strongly positive B cell fluorescence crossmatch. *Transplantation* 1994;57: 964-969.
72. Ettinger RB, Terasaki PI, Opelz G et al. Successful renal allografts across a positive cross-match for donor B-lymphocyte alloantigens. *Lancet* 1976;2: 56-58.
73. Lobashevsky AL, Senkbeil RW, Shoaf J et al. Specificity of preformed alloantibodies causing B cell positive flow crossmatch in renal transplantation. *Clin Transplant* 2000;14: 533-542.
74. Paul LC, van Es LA, van Rood JJ, van Leeuwen A, de la Riviere GB, de Graeff J. Antibodies directed against antigens on the endothelium of peritubular capillaries in patients with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1979;27: 175-179.
75. Yard BA, Spruyt-Gerritse M, Claas FHJ et al. The clinical significance of allospecific antibodies against endothelial cells detected with an antibody-dependent cellular cytotoxicity assay for vascular rejection and graft loss after renal transplantation. *Transplantation* 1993;55: 1287-1293.
76. Rodriguez PC, Arroyave IH, Mejia G, Garcia LF. Detection of alloantibodies against non-HLA antigens in kidney transplantation by flow cytometry. *Clin Transplant* 2000;14: 472-478.

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Wege der Erkennung allogener MHC-Moleküle und Mechanismen der Transplantat-Abstoßung nach (29) .....	14
Abbildung 2: 5-Jahres-Überlebensrate primärer Leichennierentransplantate in Abhängigkeit von der Anzahl der <i>mismatches</i> nach ( <a href="http://www.cts.de">http://www.cts.de</a> ).....	16
Abbildung 3: 5-Jahres-Überlebensrate primärer Leichennierentransplantate in Abhängigkeit von der Anzahl der <i>mismatches</i> bei Patienten mit hoher Präimmunsierung nach ( <a href="http://www.cts.de">http://www.cts.de</a> ) .....	17
Abbildung 4: Testprinzip des MAILA nach (44) .....	33
Abbildung 5: Vergleich der Sensitivitäten von LCT und MAILA.....	47
Abbildung 6: Anteil der HLA-DR Antikörper-positiven Ansätze an den pro Gruppe insgesamt getesteten Ansätzen (in % ).....	50
Abbildung 7: Anteil der Patienten mit Nachweis <i>mismatch</i> -spezifischer HLA-DR Antikörper pro Gruppe.....	56

## 7.5 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Ursachen früher postoperativer Dysfunktion bei Nierentransplantaten nach (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10) und (11).....	8
Tabelle 2: Unterschiede zwischen HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Molekülen.....	12
Tabelle 3: Serologische Spezifitäten und Allele der verwendeten B-Zelllinien aus dem 10. Internationalen Histokompatibilitäts <i>Workshop</i> .....	29
Tabelle 4: Ermittlung der optimalen Konzentration des HLA-DR monoklonalen Antikörpers L.243 .....	37
Tabelle 5: Bestimmung des im MAILA benötigten Volumens an Patientenserum .....	38
Tabelle 6: Bestimmung der optimalen Verdünnung des monoklonalen Ziege Anti-Mensch Fc $\gamma$ Antikörpers .....	39
Tabelle 7: Patientencharakteristika.....	45
Tabelle 8: HLA-DR mismatches in den drei Untersuchungsgruppen .....	46
Tabelle 9: Geschlechterverteilung: Patienten mit Abstoßung vs. Patienten in Kontrollgruppe .....	46
Tabelle 10: Ergebnismuster von Serum 1 (Anti-HLA-DR4 und –DR14 positiv) und Serum 2 (Anti-HLA-DR12 und –DR14 positiv) im MAILA nach Absorption mit den angegebenen Zelllinien .....	48
Tabelle 11: Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne HLA-DR Antikörper positiven Seren und Patienten mit und ohne Spender-Empfänger <i>mismatch</i> in den drei Gruppen .....	51
Tabelle 12: Darstellung der Prävalenz von nachweisbaren HLA-DR Antikörpern vor der Transplantation .....	52
Tabelle 13: Gegenüberstellung von Patienten mit und ohne HLA-DR Antikörper-positiven Seren nach Geschlecht stratifiziert.....	52
Tabelle 14a: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Gruppe A (Akute Abstoßung).....	53
Tabelle 14b: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Gruppe B (Chronische Abstoßung)....	53
Tabelle 14c: HLA-DR Antikörper bei Patienten der Kontrollgruppe.....	54

Tabelle 15: Zusammenhang der Prävalenz und Spezifität von HLA-DR Antikörpern und dem klinischen Schicksal des Transplantats bei Patienten mit HLA- DR inkompatiblen Transplantat.....	55
---	----

53 Tabellen mit den Extinktionswerten aller Tests im Anhang unter Punkt 7.2  
67ff

## 8 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 04.09.2007

Fabrice Renner



## 9 Zusammenfassungen

Die klinische Bedeutung von HLA-DR Alloantikörpern im Rahmen der Nierentransplantation ist nach wie vor ungeklärt. Dies kann teilweise durch die mangelhafte Spezifität und Sensitivität der gängigen Antikörper-Detektions-Methoden, z.B. Lymphozytotoxizitätstest mit B-Zellen als Antigen-Trägern, erklärt werden.

In der vorliegenden Studie haben wir die Inzidenz und die Spezifität von HLA-DR Antikörpern nach Nierentransplantation mit Hilfe des glykoproteinspezifischen Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Leukocyte antigens Assay (MAILA) untersucht. 53 Leichennierenempfänger (erstes Transplantat) aus einer prospektiven Studie wurden retrospektiv einer der folgenden Gruppen zugeordnet: 20 Patienten ohne Abstoßung (Kontrollgruppe), 20 Patienten, mit akuter Abstoßung innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation und 13 Patienten mit chronischer Abstoßung. 105 prospektiv gesammelte Patientenserum wurden mit dem MAILA unter Verwendung von 13 homozygoten lymphoblastoiden B-Zelllinien, welche die häufigsten HLA-DR Spezifitäten exprimierten, untersucht.

In der Kontrollgruppe wurden nur bei einem von 20 Patienten (5,3%) ohne akute Abstoßung HLA-DR Antikörper nach Transplantation nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden bei 36,8% (7 von 19) und bei 69,2% (9 von 13) Patienten mit akuter respektive chronischer Abstoßung HLA-DR Alloantikörper nach Transplantation detektiert. In beiden Studiengruppen lag die Anzahl HLA-DR Antikörper positiver Seren signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bei fünf der 17 Patienten mit HLA-DR inkompatiblem Transplantat wiesen wir spenderspezifische Alloantikörper nach. Die Mehrheit der nachgewiesenen Antikörper war jedoch nicht spezifisch für HLA-DR Alloantigen-Differenzen.

HLA-DR Antikörper waren signifikant mit Transplantatabstoßung bei ersttransplantierten Leichennierenempfängern assoziiert, vor allem bei Patienten mit chronischer Abstoßung. Obwohl die HLA-DR Antikörper in der Mehrheit der Fälle nicht spender-spezifisch waren, könnte die Überprüfung dieses Parameters die Diagnose einer Transplantatabstoßung unterstützen.

**Background:** The clinical impact of HLA-DR alloantibodies in renal transplantation is still controversial. This may be partly due to the lack of specificity and sensitivity of current detection methods, e.g. complement dependent cytotoxicity test employing B lymphocytes as target antigens.

**Material and Methods:** In this study, we analyzed the incidence and specificity of HLA-DR antibodies after renal transplantation by use of the antigen specific capture assay Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Leukocyte antigens Assay (MAILA). 51 primary cadaver kidney recipients were recruited for a prospective study and were retrospectively assigned to the following groups: 20 patients with unsuspecting clinical course within the first three months after transplantation (control group), 20 patients undergoing histologically proven acute rejection within the first three months after transplantation, and 13 patients with chronic rejection one year or later after transplantation. 105 patients' sera collected prospectively were analyzed by MAILA using 13 homozygous B-lymphoblastoid cell lines (B-LCL) carrying the common HLA-DR specificities.

**Results:** In the control group, only one of 19 patients (5.3%) without acute rejection revealed HLA-DR antibodies after transplantation. In contrast, post transplant HLA-DR alloantibodies could be detected in 36.8% (7/19) and 69.2% of patients (9/13) with acute and chronic rejection, respectively. The frequency of HLA-DR antibodies present in both study groups was significantly higher in comparison to the control group. Of the 17 patients who received a graft across a donor recipient HLA-DR mismatch five patients exhibited donor specific alloantibodies. However, the majority of antibodies detected was not specific for mismatched HLA-DR alloantigens.

**Conclusion:** HLA-DR antibodies were significantly associated with transplant rejection in first cadaver renal transplantation, especially in patients undergoing chronic rejection. Although donor specificity was not observed in the majority of patients, monitoring of HLA-DR antibodies might support diagnosis of graft rejection.

## 10 Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. G. Bein möchte ich für die Auswahl dieses interessanten und herausfordernden Themas und seine ständige wissenschaftliche und organisatorische Betreuung danken.

Herrn Dr. rer. nat. S. Santoso gilt mein Dank für die wertvolle Hilfestellung bei den auf diese Aufgabe bezogenen theoretischen und praktischen Problemen sowie seine vielen hilfreichen Ratschläge bei der Niederschrift der Ergebnisse.

Frau K. Hau, Frau C. Mulot, Frau H. Volkmann und Frau M. Feigl bin ich dankbar für die freundliche Aufnahme im HLA-Labor. Frau H. Kluger hat mir bei Einarbeitung und Durchführung des MAILA wertvolle Ratschläge zuteil werden lassen. Ihr gilt ebenso mein Dank.

Nicht zuletzt möchte ich auch Frau R. Adam und Frau Dr. vet. med. C. Weiken und Frau Dr. vet. med. B. Carl für die stets herzliche Arbeitsatmosphäre danken.

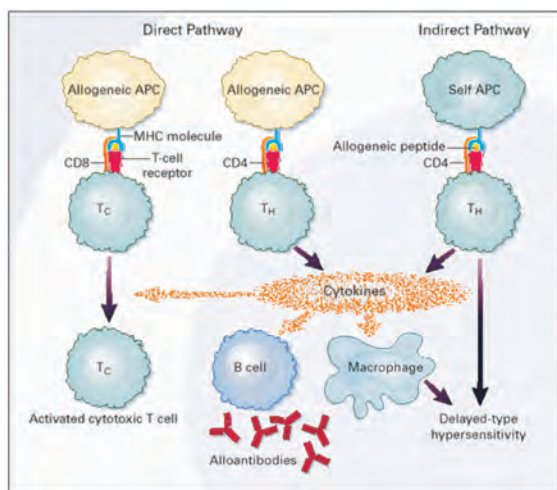
Frau S. Adel schulde ich Dank für Ihre kritische Durchsicht der Dissertationsschrift und Ihre vielen hilfreichen Ratschläge.

Frau K. Retzlaff war mir während der Zeit meiner Laborarbeit und der späteren schriftlichen Niederlegung der Ergebnisse eine liebe Freundin, die mir immer wieder aufs Neue ein nachahmenswertes Vorbild an Arbeitseifer und Disziplin vorlebte.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre liebevolle moralische Unterstützung.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



edition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
 STAUFENBERGRING 15  
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
 redaktion@doktorverlag.de  
 www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5582-0



© Dmitry Khorre - Fotolia.com